Série U - N° 144

UNIVERSITÉ DE PARIS
FACULTÉ DE PHARMACIE

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE L'HYDROLYSE DE LA LECITHINE D'ŒUF

THÈSE

pour

l'obtention du titre de Docteur de l'Université de Paris (Pharmacie)

présentée et soutenue le

PAR

HUBERT GUITARD
Pharmacien
Ex-Interne des Hôpitaux Psychiâtriques de la Seine

JURY :

M. P. FLEURY, *Président*
M. J. A. GAUTIER, *Professeur*
M. J. COURTOIS, *Maître de Conférences*

CENTRE DE DOCUMENTATION UNIVERSITAIRE
TOURNIER ET CONSTANS
5, Place de la Sorbonne, 5
PARIS - V°
1949

Personnel de la Faculté de Pharmacie de Paris

ADMINISTRATION :

MM. René FABRE, *Doyen*, ✻, ✠ I.
N... *Assesseur.*
G. CUVIER, *Secrétaire*, ✠ I.
L. JEANDEL, Rédacteur, ✠ A.

PROFESSEURS :

MM.	FABRE, ✻, ✠ I.	Toxicologie.
	PICON, ✻, ✠ I.	Chimie minérale.
	DELABY, ✻, ✠ I.	Pharmacie chimique.
	MASCRE, ✻, ✠ I.	Botanique.
	SARTORY, C. ✻, ✠ I.	Microbiologie.
	FLEURY, ✻, ✠ I.	Chimie biologique.
	JANOT, ✠ I.	Pharmacie galénique.
	CHARONNAT, ✠ I.	Chimie organique.
	[illegible], ✠ I.	Zoologie appliquée.
	BEDEL, ✻, ✠ I.	Législation, Déontologie et Histoire de la Pharmacie.
	PARIS	Histoire natur. des médicaments simples et d'origine végétale.
	GUILLOT	Physique.
	GAUTIER, ✠ I.	Chimie analytique.
	RAOUL	Professeur sans chaire.

Doyen Honoraire : M. RADAIS, O.✻, ✠ I.

Professeurs Honoraires :

MM. DELEPINE, O. ✻, ✠ I. et LEBEAU, O ✻, ✠ I., Membres de l'Institut. PERROT, C.✻, ✠ I., COUTIERE, O.✻, ✠ I., BOUGAULT, O.✻, ✠ I., LUTZ, ✻, ✠ I., GORIS, O.✻, ✠ I., HERISSEY, O.✻, ✠ I., LAUNOY, O.✻, ✠ I., SOMMELET, ✻, ✠ I.

MAITRES DE CONFERENCES :

MM.	DOMANGE, ✠ I.	Sciences physiques et chimiques.
	CRETE	Sciences naturelles.
	COURTOIS	Sciences physiques et chimiques.
	MORETTE	Sciences naturelles.
	LAMBIN (Mlle), ✠ I.	Hydrologie et Hygiène.
	CAVIER	Sciences naturelles.

CHEFS DES TRAVAUX PRATIQUES :

MM.	CORRIEZ, ✠ I.	Physique.
	HARISPE, travaux pratiques de 1re année	Chimie générale et pharmaceutique.
	TRUHAUT, ✻, ✠ I.	Chimie 4e année.
	MOREAU	Chimie analytique.
	DEYSSON	Botanique.
	GERMAN	Microbiologie (Ch. de fonctions).
	N...	Biologie animale.

Bibliothécaire en Chef : M. GARNIER, ✠ I.
Bibliothécaire : Mlle LAVAUD, ✠ A.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

A MONSIEUR LE PROFESSEUR P. FLEURY

Pharmacien-Chef des Hôpitaux Psychiatriques de la Seine
Chevalier de la Légion d'Honneur

De qui nous avons eu l'honneur d'être l'interne, et à qui nous devons le sujet de ce travail; nous le remercions vivement de ses conseils et de ses leçons. Qu'il trouve ici l'expression de notre respectueuse gratitude.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR J. A. GAUTIER

Pharmacien-Chef des Hôpitaux Psychiatriques de la Seine

Respectueux hommage

A MONSIEUR J. COURTOIS

Maître de Conférences à la Faculté de Pharmacie de Paris
Pharmacien des Hôpitaux de Paris

Reconnaissance respectueuse

A MA FAMILLE

A MES AMIS

INTRODUCTION

La lécithine d'oeuf, découverte par Gobley en 1864, est le prototype d'une famille naturelle de composés réunis à l'heure actuelle sous le nom de phosphoaminolipides et dont le rôle dans le métabolisme intermédiaire apparaît de plus en plus important.

Sa constitution semble établie sur des bases expérimentales solides, mais seulement dans ses grandes lignes. Cette restriction provient du fait que certaines de ses propriétés constituent un obstacle considérable à sa purification.

On semble fondé à admettre que si on pouvait l'isoler à l'état d'espèce chimique pure, la molécule de lécithine d'oeuf donnerait par hydrolyse complète une molécule d'acide phosphorique, une molécule de glycérol, deux molécules d'acides gras, et une molécule de choline. On est en général d'accord sur le mode d'union de ces divers constituants. L'isolement facile de l'acide glycérophosphorique (extrait dès le début par Gobley) constitue un appui solide pour la constitution admise. Les deux molécules d'acides gras viennent de toute évidence estérifier les deux oxhydriles libres de l'acide glycérophosphorique, enfin la choline qui n'est pas libérée immédiatement par les alcalis, semble unie par estérification de son -OH alcoolique à l'une des fonctions acide libre de l'acide glycérophosphorique. Un solide appui expérimental à cette conception résulte des travaux de Mac Farlane et Knight 1 qui ont montré que la lécithase du Clostridium Welchii scindait la lécithine d'oeuf en un diglycéride et en l'ester cholinophosphorique isolé déjà par d'autres auteurs dans d'autres conditions. Comme la lecithine est pratiquement neutre, on admet que la choline ainsi estérifiée salifie par sa fonction basique le deuxième -OH de l'acide glycérophosphorique.

A dire vrai, si cette formule paraît satisfaisante, c'est qu'elle n'a été jusqu'ici contredite par aucun fait; mais elle n'est étayée ni par la détermination du poids moléculaire, ni par la synthèse, qui ne semble pas avoir encore donné de résultats définitifs. (D'ailleurs l'identification des composés obtenus par synthèse se heurte à de nombreuses difficultés, en particulier au nombre d'isomères possibles qui, même avec cette formule, résulte de la position et de la nature des acides gras et de l'acide glycerophosphorique (α ou β). Les biochimistes n'ont même pas pu se mettre d'accord sur ce dernier point, qui paraît au premier abord assez facile à fixer depuis l'établis-

sement des méthodes de dosage de l'isomère α en présence de l'isomère β.

Or Mr. P. Fleury 2 étudiant l'hydrolyse de la lécithine d'oeuf en milieu méthylique par la potasse à froid a constaté que, même après libération complète des acides gras et de la choline, l'acide glycérophosphorique attendu n'apparaissait qu'en prolongeant l'hydrolyse comme si ce glycérophosphate existait primitivement dans la lécithine sous une forme "dissimulée". Ce sont ces observations qui ont servi de point de départ à nos recherches.

Le but principal de ce travail a été de suivre systématiquement l'hydrolyse de la lécithine en milieu méthylique alcalin à froid en fonction du temps, en étudiant méthodiquement le sort des divers constituants de ce composé.

Cette étude a confirmé et précisé les premières observations de Mr. Fleury. Elle a permis d'apporter ensuite une contribution à l'isolement de la forme dissimulée de l'acide glycérophosphorique à laquelle Mr. Fleury a donné le nom de glycérophosphatogène et de mettre en évidence quelques propriétés de celui-ci.

Nous ne saurions trop remercier le Professeur P. Fleury de la patience inlassable qu'il nous a montrée au cours de ce travail et des leçons qu'il nous a données. Nous adressons notre respectueux hommage à Mr. J. A. Gautier pour l'intérêt qu'il nous a porté depuis notre concours d'internat. Que Mr. J. Courtois, qui s'est toujours intéressé aux progrès de notre étude, soit assuré de notre gratitude.

Notre travail se répartit ainsi en six chapitres :

Chapitre I : Techniques de dosages utilisées

Chapitre II : Etude de la matière première

Chapitre III : Etude de l'hydrolyse

Chapitre IV : Tentatives d'isolement du glycérophosphatogène

Chapitre V : Quelques propriétés du glycérophosphatogène

Chapitre VI : Essai d'hydrolyse d'échantillons de lécithine purifiée préparée à partir de la lécithine cadmique.

-:-:-:-:-

CHAPITRE I

TECHNIQUES DE DOSAGE UTILISEES

Les techniques de dosage que nous donnons ci-dessous concernent :

- A. Dosage du phosphore.
- B. Dosage de l'azote.
- C. Dosage du cadmium.
- D. Dosage de la choline.
- E. Dosage de la colamine en présence de la choline.

A. - DOSAGE DU PHOSPHORE

Au cours de notre travail nous avons eu à effectuer de nombreux dosages de phosphore sous différentes formes. Le choix des dosages a été guidé par les quantités minimes de substance dans laquelle nous devions doser le phosphore.

Nous nous sommes arrêté dans la pratique courante à la méthode nitro-vanado-molybdique de Misson adaptée par Fleury et Leclerc 3 , qui nous a donné entière satisfaction : méthode colorimétrique utilisant la coloration jaune intense obtenue lorsqu'on traite une solution phosphorique en milieu nitrique convenable par un réactif contenant à la fois du molybdate d'ammonium et du vanadate d'ammonium. Nous dosons ainsi des prises d'essai contenant entre 10 et 30 μgr de phosphore.

Pour faire certains contrôles nous nous sommes servi de la méthode de Neumann qui nécessite des quantités de phosphore supérieures. Avec cette méthode les prises d'essai doivent renfermer entre 0,3 mg. et 1 mg. de phosphore.

1° Dosage du phosphore minéral.

Il est dosé directement par addition du réactif de Misson.

- Réactifs -

R.I. Solution de molybdate d'ammonium :

Molybdate d'ammonium	100 g
Solution officinale d'ammoniaque	10 cm^3
Eau distillée	1 litre

La solution d'ammoniaque est destinée à stabiliser la solution.

R.II. Solution de métavanadate d'ammonium M/50 :

Méta-vanadate d'ammonium (VO_3NH_4)	2,345 g
Dissoudre à chaud dans eau	400 cm^3
Refroidir. Y verser lentement et en agitant le mélange :	
Acide Nitrique (d=1,38)	7 cm^3
Eau	13 cm^3

Le précipité rouge produit au début de l'addition d'acide nitrique se redissout ensuite par agitation convenable dans l'excès de réactif (sauf parfois quelques légers flocons).

Compléter ensuite à 1000 cc.

R.III. Réactif nitro-vanado-molybdique.

On mesure successivement :

Acide nitrique (d=1,38)		67 cm^3
Solution de molybdate (R.I)		100 cm^3
Solution de vanadate (R.II)		100 cm^3
Eau	qsp	500 cm^3

R.IV. Solution mère d'orthophosphate à 1 mg. de P_2O_5 par centimètre cube ou 0,4365 mg. de phosphore.

Phosphate monopotassique pur (PO_4KH_2)		1,915 g
Acide nitrique (d=1,38)		50 cm^3
Eau	qsp	1.000 cm^3

L'addition d'acide nitrique a pour but d'assurer la conservation pratiquement indéfinie du réactif.

R.V. Solution diluée de phosphate.

Diluer R.IV. au 1/10. A préparer au moment du besoin.

1 cm3 = 0, 1 mg de P_2O_5 = 0,04365 mg. de P.

Mode d'emploi

On mélange des volumes égaux de solution phosphorique et de réactif nitro-vanado-molybdique. On laisse la coloration se développer complètement (minimum 7 à 8 minutes à une température de + 20° C.) La couleur ainsi obtenue est d'une stabilité remarquable, on peut ainsi conserver sans précaution spéciale des flacons bouchés sans noter de différence pendant 3 semaines - 1 mois. On procède à la mesure avec l'électrophotomètre de Bonet-Maury, la cuve remplie de réactif étant intercalée dans la marche des rayons lumineux pour établir le zéro. On utilise le filtre violet n° 1 (= 460).

L'électrophotomètre a été étalonné avec une solution de titre connu en phosphore :

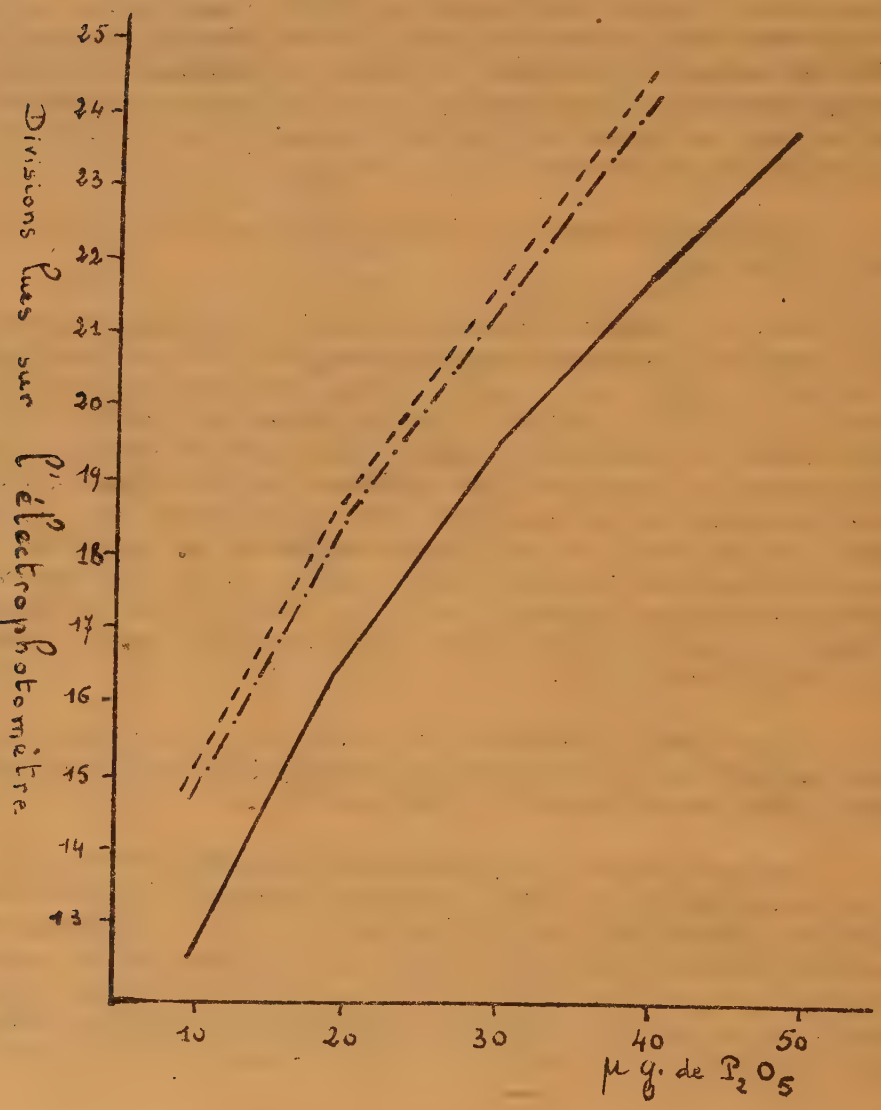
Dans des tubes à essais contenant déjà exactement mesurés 5 cm³ de réactif nitro-vanado-molybdique on ajoute successivement 0,5 - 1,0 - 1,5 - 2,0 ..... 4,5 - 5,0 cm³ de la solution diluée de phosphate (R.V.) et on complète à 10 cm³ avec de l'eau distillée, on mélange, attend 10 minutes et procède à la lecture dans les conditions que nous venons de préciser. Les chiffres lus permettent d'établir une courbe en fonction de la concentration en phosphore. Si l'on porte en abscisses les chiffres lus sur le micromètre et en ordonnées les concentrations en phosphore on obtient une courbe qui est une droite pour des concentrations variant entre 10 et 40 µg de P_2O_5 par cm³. Au-dessus de 40 µg de P_2O_5 par cc. la courbe s'infléchit peu à peu par rapport à l'axe des abscisses.

Il est donc préférable de faire les mesures dans la zone comprise entre 10 et 40 µg de P_2O_5 par cm³ ; lorsque la concentration est plus forte nous diluons convenablement.

Nous ne pouvons ici que montrer la fidélité des mesures effectuées en reproduisant 3 courbes prises au hasard et qui ont des allures sensiblement identiques. Les différences que l'on peut noter en valeur absolue dépendent du réactif utilisé. Les origines de ces courbes sont différentes car la coloration initiale du réactif de Misson peut varier légèrement, sans que les quantités de phosphore trouvées soient différentes, si l'on se rapporte à la courbe étalon établie avec le même

réactif que celui utilisé pour le dosage.

Dosage colorimétrique du phosphore
par le réactif de Misson



2° Dosage du phosphore total.

Nous devons détruire la matière organique et sur la solution ainsi minéralisée nous pouvons facilement doser le phosphore par la méthode décrite ci-dessus.

Destruction sulfonitrique

Nous avons dû renoncer à l'utilisation de la destruction sulfonitrique car nous avons toujours obtenu des chiffres trop faibles.

Toutefois nous devons préciser que ces chiffres de phosphore inférieurs à ceux prévus, étaient ceux relatifs à des dosages de phosphore dans des solutions de lécithine donc avec des rapports phosphore-matière organique très faibles, il semble que l'erreur par défaut diminue de plus en plus au fur et à mesure que la proportion de phosphore par rapport à la matière organique augmente, ce qui explique sans doute que la question ait soulevé de nombreuses controverses. Ainsi par exemple si l'on prend les chiffres trouvés au cours du dosage du phosphore dans la lécithine cadmique on trouve respectivement :

Destruction nitromagnésienne	2,80 p. 100
Destruction sulfonitrique	2,51 p. 100

Minéralisation par voie sèche

Réactifs

R. I Solution de nitrate de magnésium à 50 g. pour 100 cm^3 de solution.

R. II Acide nitrique (d=1,38)

R.III Solution d'acétate de sodium à 25 g. pour 100 cm^3 de solution.

Mode opératoire

La prise d'essai solide ou liquide doit contenir entre 100 et 500 μg de P_2O_5. Il parait préférable d'opérer sur une solution car la destruction se fait d'une manière plus homogène. La prise d'essai est introduite dans un creuset ou une capsule de porcelaine avec bec,

à fond plat, de 3 cm, de diamètre, nous additionnons de 0,3 à 0, cm^3 de la solution de nitrate de magnésium (R.I) et de 0,3 cm^3 d'acide nitrique (R.II). Nous portons sur la plaque chauffante la capsule munie de son couvercle jusqu'à obtention d'un résidu sec, puis nous calcinons au four à moufle ou au four électrique à une température ne dépassant pas 600° pendant 20 à 30 minutes. Nous obtenons le plus souvent des cendres blanches; au cas où il resterait des traces charbonneuses, nous reportons au four jusqu'à obtention de cendres blanches. Nous laissons refroidir.

Au début de notre travail nous dissolvions le résidu dans quelques gttes d'acide(R.II) et quelques centimètres cubes d'eau. Mais nous nous sommes aperçu que la quantité d'acide nitrique n'était pas indifférente, l'expérience suivante le montre :

En reprenant notre résidu contenant 0,2 mg. de P_2O_5 dans des conditions par ailleurs identiques, soit par 0,5 soit par 2 cm^3 d'acide nitrique, la quantité de phosphore d'après la mesure photométrique est de 0, 185 et de 0,03 mg (exprimés en P_2O_5).

La quantité d'acide nitrique introduite dans la réaction a donc une grande importance sur le développement de la réaction colorée et sur son intensité. Il nous a paru préférable d'ajouter alors une solution tampon d'acétate de sodium.

Finalement le résidu des cendres contenu dans la capsule après calcination est repris par 0,5 cm^3 d'acide nitrique et après dissolution par 5 cm3 de solution d'acétate de sodium à 25 p. 100 (R. III) en grattant les parois de la capsule et le couvercle avec un agitateur muni d'un caoutchouc et en rinçant avec de l'eau distillée à plusieurs reprises, les liquides étant versés dans une fiole jaugée de 10 ou 20 cm3 selon la concentration en phosphore. Le liquide ainsi obtenu est parfaitement limpide et se prête bien au dosage opéré comme précédemment.

Mais au bout d'un certain nombre d'opérations la couverte des capsules est attaquée et l'on obtient alors un liquide trouble qu'on peut clarifier par centrifugation. Toutefois nous préférons rejeter ces capsules de peur d'entraîner de la silice qui risquerait de fausser le dosage soit par excès puisque le réactif nitro-vanado-molybdique donne également une coloration jaune avec le silicium, soit par défaut par entraînement d'un peu de phosphore dans le culot de centrifugation.

3° Dosage du phosphore glycérophosphorique.

Au cours de notre travail nous avons dû faire très fréquemment des dosages du phosphore sous forme de glycérophosphate.

M.C. Bailly [4] a établi que le glycérophosphate de sodium présente une vitesse maxima d'hydrolyse vers pH = 4,1. Nous avons observé que, pour obtenir une hydrolyse totale à ce pH, il fallait chauffer 24 heures à 120° ou 48 heures à 110°, ce fait a été vérifié de la façon suivante :

Nous avons préparé une solution de α -glycérophosphate de sodium à 5 OH_2, titrant très exactement 1,07 mg. de sel hydraté par cm3. La solution de glycérophosphate est amenée à pH = 4,1, par addition d'acide N, que l'on verse goutte à goutte dans la solution jusqu'à virage au vert du vert de bromocrésol. Cette solution est ensuite tamponnée par le tampon suivant :

Acide acétique N	10 cm3
Acétate de sodium N	3,5 cm3

La solution glycérophosphorique tamponnée est introduite dans des ampoules de 5 cm3 qui sont alors portées à l'étuve à 110° pendant 48 heures, ou à 120° pendant 24 heures. Les deux séries d'ampoules contiennent à la fin de l'hydrolyse très sensiblement la totalité du phosphore sous forme orthophosphorique (dosage direct sur la solution avec le réactif nitro-vanado-molybdique). On trouve ainsi des chiffres de phosphore correspondant à 1,08 mg. de glycérophosphate par cm3 de solution.

Nous avons utilisé le même processus expérimental pour les solutions dans lesquelles nous voulions déterminer le phosphore existant sous forme glycérophosphorique. La solution est amenée à pH = 4,1 par addition selon les cas d'acide ou d'alcali N/1 ou N/10 jusqu'à virage du vert de bromocrésol, cette solution est additionnée du tampon acétique et amenée à un volume connu. La solution est introduite dans les ampoules de 5 cm3 qui sont scellées et portées à l'étuve pendant 48 heures à 110°, ou 24 heures à 120°. Le phosphore libéré est dosé avec le réactif nitro-vanado-molybdique.

4° Dosage du phosphore par la méthode de Neumann modifiée par Machebœuf [5].

Nous ne donnerons que le principe de cette méthode. Le phos-

phore est transformé en phosphomolybdate d'ammonium qui est dissous dans l'ammoniaque les acides phosphorique et molybdique du précipité sont alors titrés l'ammoniaque est éliminée par ébullition en présence de soude titrée. L'excès de soude, non combiné aux deux acides est déterminée par un dosage acidimètrique par retour.

B. - DOSAGE DE L'AZOTE.

Le dosage de l'azote total a toujours été effectué en déterminant l'ammoniac entraîné par la vapeur d'eau dans l'appareil de Pregl, après minéralisation dans un micro-Kjeldhahl.

La prise d'essai renfermant des quantités d'azote comprises entre 0,07 et 1,5 mg, était soit à l'état solide soit à l'état liquide. Dans le cas d'une prise liquide, comme très souvent il s'agissait d'un solvant volatil, nous avons préféré faire évaporer le solvant au bain-marie avant la destruction. La minéralisation se fait comme de coutume en présence d'acide sulfurique pur et d'un mélange destructeur, nous avons constamment utilisé le mélange proposé par Boivin [6], que nous avons complété par l'adjonction de sélénium pulvérisé :

Sulfate de potassium	13 g
Sulfate de cuivre	3 g
Oxyde rouge de mercure	3 g
Sélénium pulvérisé	0,1 g

Les solutions de lécithine étaient les plus longues à détruire, mais il suffisait de les laisser à feu modéré 20 minutes après décoloration. Dans certains cas nous avons constaté que, si nous opérions la destruction avec un chauffage trop poussé, nous avions des pertes d'azote qui pouvaient atteindre la presque totalité de cet élément. Il y a donc lieu de se servir de préférence d'un micro-Bunsen avec une flamme juste suffisante pour maintenir l'ébullition.

Le dosage de l'azote se fait par entraînement de l'ammoniac à la vapeur d'eau dans l'appareil de Pregl, le déplacement de l'ammoniad se fait par la solution sodique additionnée, à cause de la présence du mercure, de thiosulfate de sodium, indiquée par Boivin [6] :

Lessive de soude 36° B.....	400 cm3
Solution d'hyposulfite de sodium à 20 p. 100	200 cm3

L'ammoniac est titré directement au fur et à mesure de son dégagemant par SO^4H^2 N/50 en employant comme indicateur une solution

de rouge de méthyle et de bleu de méthylène dont la formule et le mode de préparation sont donnés dans les "Fiches de chimie biologique" de P. Fleury [7] . Du chiffre de SO^4H^2 N/50 lu on déduit le chiffre du témoin obtenu en opérant sur les réactifs seuls.

C. - DOSAGE DU CADMIUM DANS LA LECITHINE CADMIQUE.

Principe

Pour tout dosage du cadmium dans la lécithine cadmique il faut séparer le cadmium de la lécithine cadmique dissoute dans l'alcool; pour ce faire nous précipitons le cadmium à l'état d'hydroxyde par la diéthylamine, le précipité gélatineux d'hydroxyde de cadmium obtenu sert de base aux dosages.

Tout d'abord nous avons essayé de doser le cadmium par gravimétrie : précipitation à l'état d'oxyde, puis transformation en sulfate et incinération au four à moufle. Les résultats n'étant pas très réguliers nous avons adopté une autre méthode, qui nous permet, de plus, d'opérer sur des doses plus réduites.

Le précipité d'hydroxyde de cadmium est mis en solution dans l'acide chlorhydrique normal, la solution est amenée à un pH convenable par addition d'acétate de sodium et le cadmium est précipité à l'état de sulfure par le sulfure d'ammonium, le sulfure de cadmium est dissous dans un volume connu d'iode N/50, dont l'excès est titré par le thiosulfate de sodium N/50. Il faut deux atomes d'iode pour un atome de cadmium :

$$S\,Cd + 2\,I = I_2\,Cd + S$$

Technique du dosage de cadmium par iodométrie après précipitation à l'état de sulfure

Avant d'établir une technique sûre pour le dosage du cadmium dans la lécithine cadmique, nous avons cherché à préciser les conditions du dosage du cadmium dans une solution titrée de sulfate de cadmium.

A) Dosage du cadmium dans une solution de sulfate de cadmium

Les premiers dosages ont été effectués dans les conditions suivantes : le sel utilisé était le sulfate hydraté de formule $SO_4\,Cd,8\,OH_2$ en solution aqueuse. 769,2 g de ce sel contiennent 337,2 g de cadmium. C'est-à-dire qu'un litre de solution N de sulfate hydraté de cadmium correspond à 6 litres de solution d'iode N. Un litre de solution d'iode N correspond à une solution du sulfate renfermant 769,2 /6 = 128,2 g de sel.

Nous avons vérifié que le sel hydraté de cadmium avait bien le titre voulu en sulfate de cadmium sec. Une pesée dans un creuset de 1,871 g. de sel hydraté correspondant à 1,518 g. de sulfate sec est portée deux heures à l'étuve à 100°, puis une heure au four à moufle, on pèse à poids constant, on trouve 1,518, soit le chiffre théorique.

Nous préparons une solution :

sulfate de cadmium hydraté		1,282 g
eau	qsp	20 cm3

2 cm3 correspondent à 10 cm3 d'iode N/10 ou à 56,2 mg de cadmium.

2 cm3 de cette solution sont additionnés de 2 mm3 de sulfure d'ammonium dans les tubes à centrifuger, il y a formation d'un précipité jaune de sulfure de cadmium qui est centrifugé et lavé à l'eau; puis dans une expérience on acidifie par 2 cm3 HCl N/10 ,dans l'autre non. On additionne de 15 cm3 d'I N/10, qui dissout le Sulfure avec formation de soufre colloïdal, l'excès d'iode est titré par l'hyposulfite de sodium N/10 dans les tubes à centrifuger en présence d'empois d'amidon ajouté en fin de dosage.

	cm3 I N/10 consommés	mg Cd trouvé	mg Cd théorique
1) + 2 cm3 Cl H N/10	10,95	61,5	56,2
	10,60	59,5	"
2) sans acide	10,80	60,7	"
	10,70	59,9	"

Les expériences montrent d'abord que l'addition d'acide ne modifie pas les résultats, ensuite que les valeurs trouvées sont supérieures aux chiffres de cadmium théoriques et que ces valeurs sont très irrégulières.

Par ailleurs nous avons voulu modifier la concentration en acide pour voir quelle était l'influence de l'acidité, dans ces expériences nous avons effectué trois lavages par centrifugation, les deux

premiers liquides de lavage étaient colorés et opalescents, le dernier était tout à fait incolore. Dans ce cas les résultats étaient par défaut. L'emploi d'une quantité plus réduite de sulfure d'ammonium (0,5 cm3) n'a pas amélioré les résultats.

Devant d'aussi mauvais résultats, nous essayons de pratiquer le même dosage sur la solution de sulfate de cadmium précédente diluée au quarantième :

2 cm3 de cette solution diluée correspondent à 1,40 mg de cadmium, quantité voisine de celle contenue dans 10 mg de lécithine cadmique (1,13 mg). La technique utilisée reste essentiellement la même, seules sont changées les concentrations des réactifs : les prises d'essai sont de 2 cm3 de la solution diluée de sulfate de cadmium que nous précipitons par 1 cm3 de sulfure d'ammonium dilué au dixième, nous centrifugeons à 6.000 tours pendant 10 minutes, le précipité de sulfure de cadmium est lavé trois fois à l'eau par centrifugation (les eaux de lavage sont jaunes et opalescentes). Nous faisons une série de dosages en acidifiant par 0,5 cm3 d'acide chlorhydrique N avant l'addition d'iode, et une série sans acidifier. Nous dissolvons le sulfure dans 2 cm3 d'iode N/50 (dissolution du précipité avec formation de soufre colloïdal) et nous titrons par la solution de thiosulfate de sodium N/50.

1 cm3 d'iode N/50 consommé = 1,12 mg de cadmium.

Les chiffres ainsi trouvés sont nettement inférieurs aux chiffres théoriques :

	cm3 I N/50 consommés	mg Cd trouvé	mg Cd théorique
1) + 0,5 cm3 Cl H N	0,62	0,69	1,4
	0,75	0,84	"
	0,83	0,92	"
	0,65	0,72	"
2) sans acide	0,56	0,62	"
	0,60	0,67	"

Les pertes remarquées peuvent être dues à la formation de sulfure de cadmium colloïdal qui est entraîné par les eaux de lavage auxquelles il donnerait l'aspect opalescent; par ailleurs l'addition d'acide avant l'iode semble également amener une perte de sulfure d'où l'élaboration d'une nouvelle technique.:

Nous avons cherché à réduire la formation du soufre colloïdal en ajoutant une solution de chlorure de sodium :

2 cm3 de la même solution fille de sulfate de cadmium sont précipités par 1 cm3 de sulfure d'ammonium au dixième, et nous additionnons le liquide de 2,5 cm3 d'une solution de chlorure de sodium environ M/1, nous centrifugeons trois fois en lavant avec 3 cm3 de solution chlorurée, les premiers liquides sont colorés mais limpides, le culot de sulfure de cadmium est alors dissout dans 2 cm3 d'iode N/50 dont l'excès est titré par l'hyposulfite de sodium N/50.

cm3 I N/50 consommé	mg Cd trouvé	mg Cd théorique
1,07	1,19	1,40
1,09	1,21	"

Les chiffres ainsi trouvés sont bien meilleurs que ceux obtenus précédemment, tout en restant cependant encore inférieurs aux chiffres théoriques. Nous avons alors effectué la précipitation en milieu chloruré sodique :

2 cm3 de la même solution cadmique sont précipités par 1 cm3 de solution de sulfure d'ammonium diluée au dixième dans une solution de chlorure de sodium moléculaire le liquide obtenu est alors additionné de 0,5 cm3 d'une solution saturée de chlorure de sodium, les lavages sont faits par centrifugation avec 3 cm3 de solution M et 0,5 cm3 de solution saturée de chlorure de sodium. La fin du dosage s'effectue comme précédemment.

I N/50 cm3 consommé	Cd trouvé mg	Cd théorique mg	Erreur p. 100
1,19	1,33	1,40	- 5,0
1,21	1,35	1,40	- 3,5
1,19	1,33	1,40	- 5,0
1,26	1,42	1, 40	+ 0,1

Ces derniers dosages apparaissent encore plus satisfaisants toutefois nous n'obtenons pas le chiffre théorique de cadmium, nous pensons alors qu'il peut rester une très faible quantité de cadmium emprisonné dans les mailles du soufre colloïdal, qui s'est formé lors de l'addition d'iode et qui ainsi aurait été soustrait à l'action de l'iode; d'où deux séries de dosages. Une première série est traitée comme précédemment, mais le soufre colloïdal restant dans les tubes à centrifuger est mis à sécher à l'étuve à 100° et est ensuite dissous dans 1,5 cm3 de sulfure de carbone, puis addition de 1 cm3 d'iode N/50 que nous titrons ensuite par l'hyposulfite N/50. Nous faisons ensuite la somme de résultats de cadmium obtenus dans les deux parties de l'expérience; nous avons utilisé des doses différentes de cadmium.

mg Cd dosage par I direct	mg Cd dans CS_2	mg Cd total	mg Cd théorique
1,39	0,20	1,59	1,40
1,34	0,18	1,52	1,40
0,72	0,06	0,78	0,70
0,72	0,04	0,76	0,70
2,67	0,33	3,00	2,80
2,66	0,31	2,97	2,80

Dans la deuxième série d'expériences nous opérons comme précédemment jusqu'à l'addition d'iode N/50, après nous ajoutons 1,5 cm3 de sulfure de carbone et nous agitons alors très vigoureusement pour faire dissoudre le sulfure de cadmium dans l'iode, nous titrons par l'hyposulfite N/50.

cm3 I N/50 consommé	mg Cd trouvé	mg Cd théorique
1,36	1,52	1,40
0,69	0,77	0,70
0,71	0,79	0,70
2,75	3,08	2,80

Les chiffres de cadmium trouvés dans ces conditions sont supérieurs aux chiffres théoriques et il y a lieu de se demander si la consommation d'iode en excès n'a pas été utilisée par une oxydation partielle du soufre.

Dans le but d'explorer la zone de concentration où le dosage du cadmium reste satisfaisant nous utilisons la technique utilisée avant les modifications apportées par l'addition du sulfure de carbone. Cette technique sera la technique définitive.

La solution contenant le cadmium est précipitée par 1 cm3 d'une solution de sulfure d'ammonium diluée au 1/10 dans une solution de chlorure de sodium M/1, on ajoute alors 0,5 cm3 de solution saturée de chlorure de sodium, le précipité formé est centrifugé à 6.000 tours pendant dix minutes, puis est lavé 3 fois par 3 cm3 de solution chlorurée M/1 additionnée de 0,5 cm3 de solution chlorurée saturée, les liquides de lavage sont parfaitement limpides dès la première centrifugation. Le précipité de sulfure de cadmium est dissous dans 2 cm3 de solution d'iode N/50, l'excès d'iode est titré par le thiosulfate de sodium N/50 en présence d'empois d'amidon ajouté en fin de dosage. Le dosage s'effectue en totalité dans un tube à centrifuger.

Nous avons utilisé des prises d'essai contenant des quantités variables de cadmium.

cm3 I N/50 consommé	mg Cd trouvé	mg Cd théorique
1,18	1,32	1,40
1,16	1,30	1,40
0,62	0,69	0,70
0,61	0,68	0,70
2,28	2,53	2,80
2,39	2,67	2,80

Les dosages de cadmium effectués dans ces conditions sont donc meilleurs pour des doses s'étageant de 0,70 à 1,40 mg de cadmium dans la prise d'essai; lorsque la quantité de cadmium sera supérieure il suffira après un premier dosage approximatif de diluer convenablement.

Nous avons vérifié que le titrage de l'iode en excès par le thiosulfate n'était pas modifié si l'on se trouvait en milieu légèrement acide.

Nous avons jusqu'alors opéré sur une solution pure de sulfate de cadmium. Mais lorsque nous effectuons ce dosage dans une solution obtenue après destruction nitrico-magnésienne de la lécithine cadmique, elle renferme de nombreux sels, des orthophosphates, de l'acide nitrique, et du nitrate de magnésium. Nous avons voulu voir dans quelle mesure ces éléments pouvaient perturber le dosage. Le phosphore a été introduit dans la solution cadmique sous forme de phosphate monopotassique, le magnésium était sous forme de solution de nitrate à 50 p. 100, l'acétate de sodium était en solution M/1, et l'acide nitrique avait une densité de d = 1,33.

Nous préparons différentes prises d'essai contenant les éléments ajoutés au cadmium, qui est toujours utilisé sous forme de sulfate. Dans le tableau ci-dessous les chiffres indiquent le nombre de cm3 des solutions utilisées.

N° 1, 2, 3, 4 } $2\ SO_4Cd + 1\ PO_4H_2K$

5, 6 } $2\ SO^4Cd + 1\ PO^4H^2K + 0{,}1\ (NO^3)^2\ Mg$

7, 8, 9, 10 } $2\ SO^4Cd + 1\ PO^4H^2K + 0{,}1(NO^3)^2Mg + 0{,}06\ NO^3H + 1{,}4\ CH^3CO^2Na$

11 } $4\ SO^4Cd + 1\ PO^4H^2K + 0{,}1(NO^3)^2Mg + 0{,}06\ NO^3H + 1{,}4\ CH^3CO^2Na$

N°	cm3 I N/50 consommé	mg Cd trouvé	mg Cd théorique
1	1,12	1,24	1,40
2	1,20	1,34	1,40
3	1,15	1,29	1,40
4	1,14	1,28	1,40
5	1,22	1,36	1,40
6	1,20	1,34	1,40
7	1,27	1,42	1,40
8	1,25	1,40	1,40
9	1,24	1,39	1,40
10	1,23	1,38	1,40
11	2,54	2,84	2,80

Sur l'ensemble des dosages que nous avons pratiqués nous trouvons en moyenne des chiffres de cadmium inférieurs de 4 p. 100 aux dhiffres théoriques.

B) Dosage du cadmium dans la lécithine cadmique

I - Après destruction de la matière organique

Nous avons pensé tout d'abord doser le cadmium dans la lécithine cadmique après une destruction organique en utilisant la destruction nitrico-magnésienne, puis la destruction sulfo-nitrique.

1) Destruction nitrico-magnésienne

Les dosages obtenus avec ce mode de destruction ont été très décevants, très souvent nous n'avons trouvé que 25 p. 100 du cadmium théorique, ce qui nous a fait abandonner cette technique de destruction en vue du dosage du cadmium.

2) Destruction sulfo-nitrique

Après avoir détruit la lécithine cadmique par les acides sulfurique et nitrique, nous dissolvons dans l'ëau le résidu, contenu dans le micro-Kjeldhahl, la solution est amenée aux environ de pH 4,6 par addition d'ammoniaque, dans ce liquide le cadmium est dosé par iodométrie.

De plus nous avons cherché à doser le cadmium dans le liquide de destruction à l'état de sulfate, d'abord par pesée du sulfate de cadmium, ensuite par pesée du sulfate de baryum après action du chlorure de baryum; les chiffres obtenus ont toujours été trop élevés.

II - Sans destruction de la matière organique.

Nous avons pensé qu'il n'était peut-être pas indispensable de détruire totalement le composé pour le dosage du cadmium puisque en fait dans la lécithine cadmique le cadmium n'entre pas dans la molécule de lécithine, et qu'il ne se forme qu'une association : lécithine - chlorure de cadmium.

Le principe du dosage consiste à précipiter le cadmium de la lécithine cadmique à l'état d'hydroxyde par la diéthylamine, puis de doser le cadmium dans ce précipité. Nous avons tenté de le réaliser par gravimétrie à l'état de sulfate, mais nous nous sommes arrêté au dosage iodométrique mis au point précédemment.

Tout d'abord il nous fallait choisir le solvant dans lequel nous aurions :

1 - Une bonne dissolution de la lécithine cadmique
2 - Une bonne précipitation de l'hydroxyde de cadmium.

La lécithine cadmique est aisément soluble à chaud dans le méthylal, mais après addition de diéthylamine il ne se forme pas de précipité d'hydroxyde. Les mêmes raisons nous ont fait rejeter l'acétate d'éthyle bien que la dissolution de la lécithine cadmique s'y fasse à froid; le chloroforme (solution également à froid) et le dioxane (solution à chaud). Nous nous sommes finalement adressé à l'alcool méthylique absolu : la dissolution de la lécithine cadmique s'y fait relativement bien à chaud (au bain-marie bouillant), la précipitation de l'hydroxyde de cadmium y est excellente.

Nous introduisons environ un gramme de lécithine cadmique dans une fiole jaugée de 100 cm3 et nous faisons dissoudre dans le méthanol au bain-marie bouillant, au moment de l'ébullition pour éviter les projections il suffit de remuer avec un agitateur; la dissolution n'est jamais complète, il y a un résidu, d'ailleurs faible, qui adhère fortement aux parois, on ne peut le détacher même avec l'aide de l'agitateur. Nous complètons à 100 cm3 quand la solution est encore tiède. Une prise d'éssai,sur laquelle nous déterminons le résidu sec, nous permet de connaître la teneur de la solution en lécithine cadmique. Nous ajoutons alors 2 cm3 de diéthylamine : (cette quantité est en net excès. En effet, 1g de lécithine cadmique renferme un peu moins de 0,2g de chlorure de cadmium; et il faut 1,6 g de déthylamine pour précipiter une molécule de chlorure de cadmium soit 0,8 g de diéthylamine pour 0,2 g de chlorure de cadmium; notre diéthylamine ayant une densité de 0,70 il en faudrait 1,14 cm3 en théorie). Il se produit un précipité floconneux jaunâtre abondant qui se dépose facilement. Le liquide et le précipité sont centrifugés, le liquide jaune surnageant contient la lécithine en solution alcoolique, la diéthylamine en excès, et le chlorhydrate de diéthylamine qui s'est formé aux dépens du chlorure de cadmium.

Le précipité d'hydroxyde de cadmium est jaunâtre, car il a entraîné avec lui un peu de lécithine du complexe cadmique, nous devons donc en conséquence le laver très soigneusement trois fois à l'alcool et une fois à l'éther par centrifugation. A chaque addition d'alcool et d'éther le précipité est remis en suspension à l'aide d'un agitateur, nous agitons le tout au moins 5 minutes à chaque opération. Nous obtenons ainsi un précipité presque blanc, que nous dissolvons dans 2 cm3 d'acide chlorhydrique normal, la dissolution n'est pas totale. Le résidu est brun (lécithine?), nous le séparons par filtration, le liquide recueilli est ainsi amené à 20 cm3 avec de l'eau distillée.

Nous prenons une partie aliquote de la solution chlorhydrique

contenant environ 1 mg de cadmium. La solution de pH voisin de 4,6 (vérification à la touche avec le rouge de méthyle) est traitée sans apporter aucune modification à la technique définitive établie pour le dosage du cadmium dans une solution de sulfate de cadmium.

cm3 I N/50	mg de Cd valeur trouvée	mg de Cd valeur après correction	mg de Cd théorique
0,79	0,89	0,92	0,92
0,78	0,88	0,91	0,92
1,85	2,07	2,15	1,84
1,79	1,99	2,07	1,84
0,67	0,75	0,78	0,80
0,68	0,76	0,79	0,80

Les résultats corrigés (augmentation de 4 p. 100 d'après nos résultats de la page 20), concordent d'une façon satisfaisante avec les chiffres théoriques.

D. - DOSAGE DE LA CHOLINE

Au cours de notre travail le dosage de la choline a occupé une place importante.

Tout d'abord nous avons dosé la choline gravimètriquement à l'état de silicotungstate (le phosphostungstate introduisant du phosphore dans le milieu fut rejeté). Cette méthode était simple, on pouvait peser le précipité obtenu soit sur un filtre en verre poreux taré, soit dans un tube à centrifuger taré dans lequel on effectuait la précipitation. Cependant nous avons dû la rejeter, car elle était peu sensible et ne nous permettait pas de doser des faibles quantités de choline. La sensibilité était réduite puisqu'il fallait au moins 2 mg de chlorhydrate de choline par centimètre cube de solution, pour obtenir un précipité et les pesées devaient correspondre au minimum à 100 mg, ce qui représentait près de 14 mg de choline. Un autre inconvénient était la difficulté d'éliminer par la suite l'excès d'acide silicotungstique.

Nous nous sommes alors adressé au sel de Reinecke qui nous a permis de terminer les dosages soit par gravimétrie, soit par colorimétrie.

1) Dosage de la choline par pesée du Reineckate de choline

Kapfhammer et Bischoff [8] ont les premiers montré que la choline pouvait être précipitée de ses solutions par le sel de Reineke $[Cr(NH_3)_2(SCN)_4]NH_4, OH_2$ en donnant un Reineckate de choline parfaitement cristallisé et facile à recueillir.

Nous avons cherché à établir la sensibilité de la précipitation et nous avons trouvé que 0,125 mg de choline en solution dans un centimètre cube donnaient un abondant précipité moiré, tandis que 0,025 mg donnaient encore un trouble abondant; on n'observait plus qu'une opalescence à la concentration de 0,01 mg de choline par centimètre cube; la solution alcoolique du sel de Reinecke donnant une légère opalescence avec un centimètre cube d'eau distillée.

Nous avons réalisé le dosage gravimétrique selon la technique de E. Kahane [9].

Réactifs

I - Solution aqueuse de sel de Reinecke

Sel de Reinecke	3 gr
Eau distillée	100 cm^3

Kahane indique une solubilité de 4 p. 100, mais dans la solution à 3 p. 100 on observe déjà que la totalité du sel de Reinecke ne s'est pas dissoute. La solution aqueuse est obtenue en agitant pendant 24 heures le sel de Reinecke et l'eau. On obtient une solution violet permanganate qui doit être conservée à l'abri de la lumière et à la glacière; la conservation dans ces conditions ne peut cependant excéder huit jours.

II - Solution alcoolique de sel de Reinecke. (D. Glick [10]).

Sel de Reinecke	2 g
Alcool méthylique absolu	100 cm^3

La dissolution est immédiate à froid. La conservation parait meilleure que pour la solution aqueuse.

Technique

Au début de notre travail nous utilisions la solution aqueuse. Par la suite nous avons préféré la solution alcoolique plus facile à préparer.

La prise d'essai contenant la choline à doser en solution aqueuse ou alcoolique, est amenée à un pH peu différent de 5,0 (virage au rouge-orangé du rouge de méthyle à la touche), la choline est précipitée par la solution aqueuse ou alcoolique de sel de Reinecke, utilisée en excès (lorsque le liquide surnageant le précipité demeure coloré en rose). Cette précipitation se fait dans un tube à centrifuger taré. Par addition du sel de Reinecke il se produit un précipité rose d'aspect lamellaire (ondes moirées par agitation). Ce précipité apparait plus ou moins rapidement selon la concentration de la choline; on active la précipitation en frottant les parois du tube avec un agitateur. Le tube est porté à la glacière deux heures, puis est centrifugé à grande vitesse, le culot est alors lavé trois fois de suite à l'alcool absolu en le remettant en suspension et en centrifugeant. On fait un dernier lavage à l'éther par centrifugation. On laisse s'évaporer à l'air libre l'éther restant dans le culot de Reineckate, puis on porte le tube dans le vide sulfurique et on pèse.

1 g de Reineckate de choline = 0,287 g de choline base.

Les pesées sont de l'ordre de 100 mg de Reineckate de choline ce qui correspond à 28,7 mg de choline base.

2) Dosage de la choline par colorimétrie

Lorsqu'on a de très faibles quantités de choline dans la prise d'essai, ce qui est le cas le plus fréquent, la pesée du Reineckate de choline est délicate : poids de précipité minime par rapport à celui du tube à centrifuger. Nous avons alors utilisé la méthode colorométrique selon D. Glick [10] . La choline est précipitée dans les conditions indiquées ci-dessus par le sel de Reinecke, le Reineckate obtenu est dissout dans un volume connu d'acétone, la solution acétonique rose est introduite dans la cuve d'un électrophotomètre, la lecture est faite avec un filtre vert (le maximum d'absorption du Reineckate de choline correspondant à $\lambda = 526$ mμ). La lecture doit être faite dès que le Reineckate a été dissous dans l'acétone, car les solutions acétoniques de Reineckate de choline sont très vite altérées par la lumière. A notre avis il est beaucoup plus prudent de faire le dosage photométrique dans le quart d'heure qui suit la dissolution. On connait la quantité de choline base en se rapportant à une courbe établie avec une gamme étalon de Reineckate de choline.

Gamme étalon

On prépare un Reineckate de choline par précipitation par le sel de Reinecke d'une solution de chlorhydrate de choline. Le Reineckate de choline sert à préparer une solution acétonique étalon.

(1 g de Reineckate de choline = 0,287 g de choline base cf. ci-dessus).

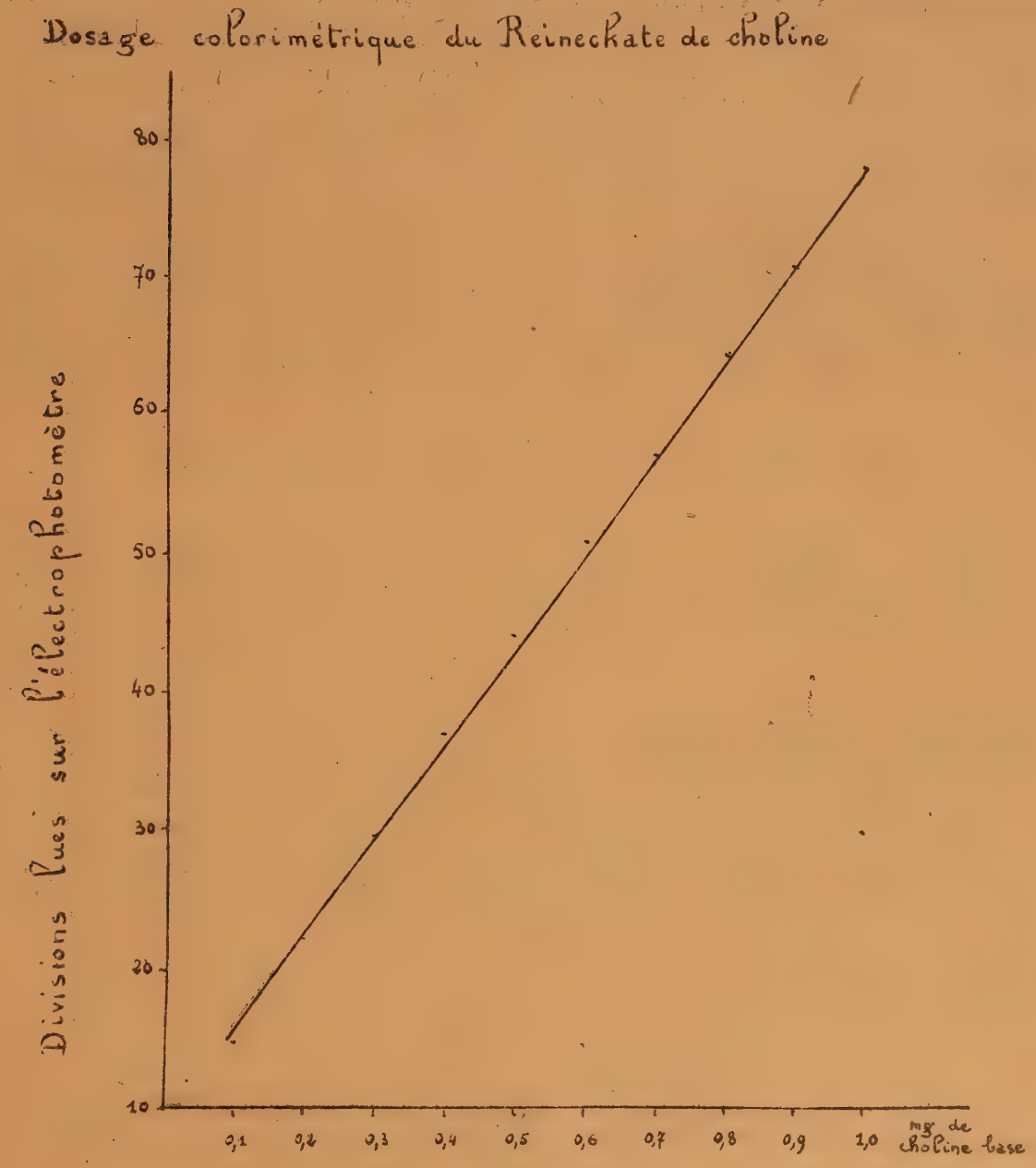
Reineckate de choline		0,353 g
Acétone	Q.S.P.	50 cm3

1 cm3 de cette solution acétonique = 2 mg de choline base.

Dans une série de tubes à essais on introduit successivement 0,5 - 1,0 - 1,5 - ..... 4,5 - 5,0 cm3 de la solution acétonique et on complète à 10 cm3 avec de l'acétone (gamme de 0,1 à 1 mg de choline base par cm3).

Nous avons utilisé l'électrophotomètre de Bonet-Maury avec le filtre n° 3 (λ = 520-570 mμ) en réglant le zéro du galvanomètre avec la cuve dans le circuit.

La courbe obtenue (abscisses : concentrations en choline; ordonnées : divisions lues sur le photomètre) est une droite très régulière si l'on opère dans les limites de concentrations citées.



Nous avons essayé d'obtenir une courbe avec des doses de Reineckate dix fois plus faibles, mais alors les chiffres trouvés sont situés de part et d'autre de la droite théorique.

Nous avons vérifié qu'avec une solution de chlorhydrate de choline de titre connu (par dosage de l'azote ou azotométrie si de choline de titre connu (par dosage de l'azote) nous obtenions des chiffres très sensiblement identiques à ceux de la courbe étalon.

Il a été possible d'obtenir une courbe exactement identique avec un reineckate de choline fraichement préparé.

E. - DOSAGE DE LA COLAMINE (AMINO-ETHANOL) EN PRESENCE DE LA CHOLINE,

I - AU MOYEN DE L'ACIDE PERIODIQUE

Au cours de ce travail nous avons été amené à rechercher et éventuellement doser la colamine (mono-amino-éthanol) en présence de choline, nous avons mis au point une méthode de dosage de cette amine, spécifique en présence de choline, par emploi de l'acide periodique [11]

On sait que la réaction de Malaprade, prise dans son sens primitif, n'intéresse que la fonction glycol α : sous l'action oxydante de l'acide periodique, la liaison qui unit les 2 atomes de carbone porteurs des fonctions alcooliques est rompue. Cette réaction a été généralisée par Mr. P. FLEURY [12] en montrant que l'acide periodique peut très souvent exercer une action semblable lorsqu'un seul des deux oxhydriles ou même parfois les deux appartiennent soit à une fonction hydrate d'aldéhyde ou de cétone ou même à une fonction acide.

Une généralisation dans une voie quelque peu différente a été faite par M. Nicolet et L.A. Shin [13] . Ces auteurs ont montré que dans la sérine ou oxyalanine, les 2 fonctions alcool et amine contigües se comportaient vis-à-vis de l'acide periodique comme s'il s'agissait d'une fonction glycol.

(1) $CH_2OH - CHNH_2 - COOH + O \rightarrow CH_2O + CHO - COOH + NH_3$

Le groupement NH^2 apparaît sous forme d'ammoniaque. Ils ont étendu cette réaction à l'homologue supérieur de la sérine : la thréonine D'après ces mêmes auteurs, la diéthanolamine, amine secondaire, est également oxydée d'une façon rapide, tandis que le diéthyl-amino-éthanol, amine tertiaire, ne réagit pas.

Nous avons pensé qu'il y avait intérêt à étudier l'action de l'acide periodique sur l'aminoéthanol ou colamine comparativement avec la choline qui ne diffère de la colamine que par transformation de la fonction amine primaire en fonction hydrate de triméthyl-ammonium. En effet il pouvait nous être utile de savoir dans certains cas si nous avions affaire à de la céphaline dont la base est l'éthanolamine ou à de la lécithine dont la base est la choline.

PARTIE THEORIQUE

L'expérience nous a montré que, comme la sérine et la thréonine, la colamine était régulièrement attaquée, lorsqu'en solution aqueuse à la concentration de l'ordre de M/10, on la traite par un excès d'une solution d'acide periodique. La réaction, dans les conditions où nous opérons se produit à la température du laboratoire (20°) elle est terminée au bout de 5 minutes environ. La quantité d'acide periodique consommé correspond à une molécule pour une molécule d'aminoéthanol, donc à la consommation d'un atome d'oxygène par réduction de l'acide periodique en acide iodique.

En réalité, on trouve, avec une bonne régularité non pas 1 atome mais 1,08 atomes d'oxygène, fait qui est peut-être en liaison avec certaines perturbations sur lesquelles nous allons revenir. Nous avons caractérisé, comme produits de la réaction, exclusivement de l'ammoniaque et de l'aldéhyde formique, sans formation d'acide formique. Les quantités trouvées pour ces deux composés correspondent sensiblement, dans certaines conditions, pour 1 molécule de colamine, à une molécule d'ammoniaque et à deux molécules d'aldéhyde formique, de sorte que nous pouvons traduire la réaction par l'équation suivante :

$$(2) \quad CH_2 NH_2 - CH_2 OH + I O_4 H = NH_3 + 2 HCHO + I O_3 H$$

Toutefois, en examinant d'une façon attentive les rendements en ammoniaque et en aldéhyde formique dans diverses conditions, nous avons constaté que, pour obtenir un rendement sensiblement théorique, il importait que la concentration en colamine de la solution soumise à l'action de l'acide periodique se maintienne au-dessous d'un certain taux; au-dessus de ce taux les quantités d'ammoniaque et celles d'aldéhyde formique obtenues s'abaissent graduellement au fur et à mesure que la concentration croît. Nous avions fait l'hypothèse de la formation d'un corps azoté intermédiaire qui ne s'hydrolyserait en ammoniaque et aldéhyde formique que si la dilution du milieu était suffisante, mais l'expérience nous a montré que l'ammoniaque non libérée n'était récupérable ni par hydrolyse en milieu acide, ni par hydrolyse en milieu alcalin. Nous avons été alors amené à penser que, par suite d'une réaction secondaire d'importance réduite, l'oxydation était poussée plus loin ou dans une autre voie et l'on comprendrait, ainsi que comme nous l'avons signalé plus heut, la consommation d'acide periodique soit plus élevée que celle prévue par l'équation 2. Mais pour rendre cette hypothèse admissible, il faudrait que cet excès de consommation d'oxygène

croisse avec la concentration de la solution de colamine. Or, des expériences portant sur des quantités constantes de colamine soumises à l'action d'un même excès d'acide periodique mais après dilution dans des quantités variables d'eau, nous ont donné des consommations constantes d'acide periodique donc indépendantes de la concentration des corps réagissants et correspondant à une consommation de 1,08 atomes d'oxygène par molécule de colamine. D'ailleurs, nous n'avons pu déceler la formation ni de nitrite, ni de nitrate, ni d'anhydride carbonique dans les expériences qui manifestaient un déficit en ammoniaque.

Depuis il a été démontré par Mr. Grandchamp (inédit), dans le laboratoire où ce travail a été effectué, qu'en fait il y avait bien production d'anhydride carbonique dans la proportion correspondant au 1/10e d'atome trouvé en trop dans nos propres expériences.

Une étude parallèle menée sur la choline, nous a montré que, contrairement à ce qui a lieu pour la colamine, l'acide periodique n'exerce aucune action sur ce composé, même en faisant varier l'acidité du milieu dans d'assez larges limites. Il semble donc que, comme l'ont observé Nicolet et Shinn pour une amine tertiaire : le diéthylamino-éthanol, les amines α-hydroxylées à une fonction ammonium quaternaire ne soient pas non plus oxydées.

Cette résistance de la choline est extrêmement marquée, car nous n'avons observé aucune attaque même après un séjour au bain-marie bouillant pendant 6 heures. Elle est comparable à celle que P. Fleury et Melle Boisson [14] ont observé pour l'acide acétique et nous paraît supérieure à celle de l'alcool éthylique qui, dans ces mêmes conditions (6 h. au bain-marie bouillant) est légèrement attaqué. La substitution dans l'éthanol d'un des hydrogènes du groupement méthyle par le groupement triméthylammonium renforce donc la résistance de la molécule à l'attaque de l'acide periodique tandis que la substitution de ce même hydrogène par le groupement NH_2 la rend très labile vis-à-vis de ce réactif. Peut-être pourrait-on considérer cette résistance comme un cas d'empêchement stérique. Quoiqu'il en soit, cette inertie de la choline nous a permis de tenter le dosage de la colamine en présence de ce composé. Nous avons constaté que, comme on pouvait l'espérer, la choline n'apportait aucune perturbation dans l'attaque régulière de la colamine par l'acide periodique.

Cette méthode nouvelle permet donc de doser la colamine à côté de la choline qui l'accompagne si souvent.

Pour mesurer la quantité de colamine, on pourrait selon le cas utiliser une ou deux des trois possibilités résultant de la réaction : dosage de l'acide periodique consommé, dosage de l'aldéhyde formique,

dosage de l'ammoniaque. On sait que les deux derniers corps se prêtent particulièrement à d'excellents microdosages.

PARTIE EXPERIMENTALE

Nos essais ont été exécutés avec des solutions, soit de nitrate de colamine, obtenues par addition de nitrate d'argent en quantité calculée à une solution du chlorure, soit de colamine base mise aimablement à notre disposition par le Professeur Jeanne Lévy à qui nous adressons nos remerciements. Leur titre a été déterminé, dans le premier cas par dosage du chlorure avant la double décomposition, dans le deuxième cas par titrage alcalimétrique et dosage d'azote par la méthode de Kjeldhahl.

1° - Consommation d'acide periodique

Des expériences préliminaires nous ont montré que la réaction était terminée à 20°, au bout de 5 minutes. Des dosages exécutés au bout de 15 heures à 24 heures ont conduit aux mêmes résultats.

En pratique, pour éviter toute perturbation provenant d'une variation de température du laboratoire, la durée de contact a été fixée à 1 heure.

La solution de colamine (PM = 61) était M/20 pour le nitrate et M/2,5 pour la base.

La solution d'acide periodique M/5 était obtenue à l'aide de periodate trisodique additionné d'acide sulfurique en quantité calculée pour saturer l'alcali.

Le dosage était fait, après contact suffisant, en déterminant l'acide periodique qui subsistait, par la méthode à l'acide arsénieux [15]. Par différence avec un témoin sans colamine, on calculait l'acide periodique réduit. Nous donnons les volumes de solution N/10 d'iode traduisant l'acide periodique consommé par la réaction.

Nous reppellerons que la solution N/10 d'iode correspond volume à volume à la solution M/20 d'acide periodique IO_4H. Cette solution par transformation d' IO_4H en IO_3H est susceptible de libérer 1/2 atome d'oxygène.

TABLEAU I

Oxygène consommé en fonction de la concentration de la colamine

Colamine (Nitrate Sol M/20	2,5	5,0	7,5	10,0			
en cm3 (Base Sol. M/5					1,25	1,25	1,25
Sol. Iode N/10 (trouvée	3,0	5,45	8,0	10,75	5,37	5,40	5,40
cm3 consommé (calculée	2,5	5,0	7,5	10,00	5,00	5,00	5,00

Condition : 3 cm3 Sol. M/5 de IO_4H - Durée 2 heures - θ = +20° à 22°

La consommation d'acide periodique est donc constante pour un poids donné et proportionnelle au poids de colamine mise en oeuvre, mais excède d'environ 8 p. 100 la quantité de 1 mol. de IO_4H pour 1 mol. de colamine à une exception près (Tableau I). Cet excès est indépendant de la dilution comme le montre le Tableau II.

Des expériences exécutées ci-dessus, mais dans les milieux 5 N et 10 N en SO_4H_2 ont donné les mêmes résultats.

TABLEAU II

Oxygène consommé par un poids constant en fonction du volume de l'expérience.

	Eau en cm3						
	0	8	16	0	4	8	20
Colamine nitrate M/20 5 cm3.....	5,52	5,55	5,57				
Colamine base M/5 1,25 cm3....				5,37	5,35	5,40	5,40

Résultats en cm3 d'Iode N/10-Calculé pour 1 Oxygène= 5,0 cm3
Conditions : 3 cm3 Sol. M/5 de IO_4H-Durée 2 heures - Température + 20° à 22°

2° - Les produits de la réaction au double point de vue qualitatif et quantitatif

Après action de l'acide periodique, l'étude des variations de l'acidité [16] montre qu'il ne se forme aucun corps acide et que par conséquent, la formation de l'acide formique doit être exclue, d'autre part les solutions donnent les réactions classiques de l'aldéhyde formique et de l'ammoniaque. En particulier l'aldéhyde formique a été identifié par sa combinaison avec le dimédon. Il a été dosé comme dans les précédentes recherches de P. Fleury par le dimédon [17] et par le cyanure [18].

A) Dosage par le dimédon

Sol. M/20 de colamine mise en oeuvre en cm3 ...	1,0	3,75
Aldéhyde formique... trouvé en mg	2,62	9,19
calculé pour 2 HCHO	3,0	11,25
Déficit p. 100	13,3	18,3

B) Dosage par le cyanure

TABLEAU III

Dosage, après oxydation periodique de l'aldéhyde formique par cyanimétrie.

Volume en cm3 de solution de Colamine M/20 soumise à IO_4H M/5 (3,0 cm3)	Volume en cm3 de solution de Colamine M/20 qui après oxydation a été titrée en cyanure	Aldéhyde formique trouvé exprimé en cm3 de solution M/10 calculé pour 2 HCHO = 2,5 cm3	Erreur p. 100
2,5	2,5	2,70	+ 3
5,0	2,5	2,70	+ 3
7,5	2,5	2,55	+ 2,0
10,0	2,5	2,55	+ 2,0

Ces deux méthodes amènent à la même conclusion : la quantité d'aldéhyde formique produit correspond , en première approximation à 2 molécules pour 1 molécule de colamine.

L'ammoniaque a été dosée alcalimétriquement après entraînement à la vapeur d'eau dans l'appareil de Pregl. On l'a identifiée après distillation par le réactif de Nessler. Nous avons vérifié que l'aldéhyde formique ne gêne pas la distillation.

TABLEAU IV

Volume en cm3 de solution de colamine M/20 soumise à IO_4H M/5 (3cm3)	Volume en cm3 de solution de colamine M/20 qui après oxydation a été distillée	Volume en cm3 de solution M/20 d'NH_3 distillé		déficit p. 100
		trouvé	calculé	
5,0	2,5	1,82	2,5	28,2
5,0	2,5	1,84		
	2,5	1,85		
7,5	3,75	2,43	3,75	34,5
	3,75	2,46		

Ces premiers dosages montrent que le rendement en NH_3 est très loin d'être intégral et semble diminuer avec la concentration. Nous avons pensé que la présence d'un excès de periodate au moment de la distillation de l'NH_3 pouvait perturber le dosage de ce corps.

Des expériences exécutées en éliminant l'excès d'acide periodique par la baryte nous ont montré que la présence d'acide periodique n'avait aucun inconvénient.

Faisant alors l'hypothèse que l'ammoniaque était restée liée au reste carboné sous une forme hydrolysable, nous avons soumis

nos solutions, après oxydation et élimination de l'excès d'acide periodique, à une hydrolyse à 100° en milieu acide N/10 et N/1 mais sans résultats.

Après quelques autres essais non concluants, nous avons pu mettre en évidence l'influence de la dilution au moment de l'oxydation.

TABLEAU V

	Eau, en cm3, introduite dans l'expérience avant oxydation						
	0	8	16	0	4	8	20
Colamine nitrate M/20 5 cm3	0,95 0,98	0,97 1,90	1,23 1,24				
Colamine base M/5 1,25 cm3 ..				0,51 0,52	0,96 0,98	1,22 1,20	1,28 1,26

Résultats : cm3 de Sol. N/20 d'NH_3 en opérant la distillation sur un volume de solution oxydée correspondant à 1,25 cm3 de sol. de Colamine M/20, volume théorique de sol. de NH_3 N/20 = 1,25 cm3

On voit que, si la dilution est suffisante, on trouve bien une quantité d'ammoniaque correspondant à 1 mol. par molécule de colamine.

On peut penser que le déficit observé pour l'aldéhyde formique (Tableau III) relève de la même cause. Mais la comparaison des Tableaux II et V qui ne sont d'ailleurs que les deux appects d'une même expérience montre que le déficit d'ammoniaque diminuant et disparaissant avec la dilution n'a aucun rapport avec l'excès de consommation d'oxygène qui est indépendant de la dilution.

Du point de vue pratique, ces résultats montrent que si l'on veut utiliser l'ammoniaque (et aussi l'aldéhyde formique) pour apprécier avec une exactitude suffisante la quantité de colamine, il faut que la concentration de ce dernier corps dans le milieu où l'on fera agir l'acide periodique soit au-dessous d'une certaine limite qu'on peut estimer à M 80 soit environ 0,75 g de colamine base par litre.

TECHNIQUE UTILISEE

On fait réagir sur la solution aqueuse contenant la colamine, soit à l'état de base, soit salifiée, une solution d'acide periodique M/5 ou M/10, de façon à consommer au plus 50 à 60 p. 100 de la solution oxydante introduite d'après la réaction donnée plus haut. On laisse en contact 1 h.30 à 2 h. à la température du laboratoire. Selon les cas, on peut se contenter de déterminer l'acide periodique consommé et dans ce cas on admet qu'une molécule de colamine consomme 1,08 atomes d'oxygène; le plus souvent il est préférable de déterminer l'ammoniaque ou l'aldéhyde formique, mais dans cette alternative il y a lieu d'amener, si besoin est, à la suite d'un dosage d'orientation, la concentration de la colamine au-dessous du titre M/80 (environ 0,75 g. par litre). On calcule les résultats d'après l'equation indiquée précédemment.

CHAPITRE II

ETUDE DE LA MATIERE PREMIERE

A. - Lécithine d'oeuf commerciale.

Lors de nos expériences nous avons eu à notre disposition de la lécithine d'oeuf provenant de diverses sources. Bien entendu, les constantes chimiques de ces lécithines "pures" du commerce étaient sensiblement différentes et les teneurs en phosphore et en azote qui nous intéressent plus spécialement variaient dans des limites assez larges.

Solution alcoolique-mère de lécithine d'oeuf

On pèse dans un bécher de forme haute 10 à 15 grammes de lécithine que l'on additionne d'alcool méthylique absolu. Nous insistons sur l'emploi du méthanol absolu pour la préparation des solutions de lécithine car si nous utilisons de l'alcool éthylique nous n'obtenons pas les mêmes résultats. Le bécher est porté sur un bain-marie bouillant, la dissolution de la lécithine est assez rapide si l'on prend le soin d'agiter de temps en temps. On laisse alors refroidir la solution qui est transvasée, dans une fiole jaugée de 100 cm3 quand elle est à la température du laboratoire. Cette solution est maintenue à la glacière pendant 24 heures. Ce traitement a pour but d'éliminer une certaine quantité des céphalines que contiennent toujours les lécithines commerciales. On observe alors au fond de la fiole un dépôt brun adhérent (entièrement soluble dans l'éther quand il est privé de toute trace de solvant alcoolique), tandis que la solution brune renferme souvent les flocons jaunâtres qui se dissolvent dès que la solution de lécithine a atteint la température du laboratoire.

Pour connaître la teneur en lécithine de la solution il suffit de faire un extrait sec sur 2 cm3 dans un petit cristallisoir taré, porté à l'étuve à 37° pendant 24 heures, et mis ensuite 24 heures sous vide dans un dessicateur à anhydride phosphorique.

Dosage du phosphore

La solution méthylique-mère de lécithine est diluée au

dixième dans du méthanol absolu et c'est sur cette solution méthylique diluée que l'on fait le dosage du phosphore total après minéralisation nitrico-magnésienne. Le dosage est fait sur une prise d'essai de 1 cm3 pour la méthode photométrique ou de 2 cm3 pour le dosage selon Neumann, comme il a été indiqué.

Dosage de l'azote

Les dosages d'azote total dans une solution de lécithine se font également sur la solution-mère diluée au dixième dans le méthanol, dont on prend 2 cm3. Cette prise d'essai est introduite dans un micro-Kjeldhahl et l'azote y est dosé selon la technique indiquée plus haut.

Titres en phosphore et azote des différentes lécithines utilisées

Les différents échantillons de lédithine d'oeuf utilisée avaient une provenance variable, nous les désignerons sous les noms des firmes qui nous les fournirent : Fito, R.P. (Rhône-Poulenc), Merck (Allemagne), Merck (+) (U.S.A.), Armour (+), Eimer. Les chiffres donnés dans le tableau ci-dessous sont exprimés pour 100 g. de lécithine commerciale, à partir de laquelle nous avons préparé la solution alcoolique.

(+) Nous tenons à remercier tout particulièrement les firmes MERCK & Co., Manufacturing Chemists, Rahway, N.J., U.S.A. et l'ARMOUR Institute of Research, Chicago, Ill., U.S.A., qui très aimablement nous ont envoyé les quantités de lécithine d'oeuf que nous leur avions demandées.

Origine	Phosphore			Azote		Rapport N/P en atomes	
	Méthode de dosage	P p. 100	P Théorique	N p. 100	N Théorique	trouvé	Théorique
R.P.			3,86	1,47	1,74		
Fito	Neumann	3,02	"	1,69	"	0,81	1,00
Merck (All.)	Photométrie	3,20	"	1,75	"	0,82	"
Merck (U.S.)	"	2,78	"	1,67	"	0,75	"
Eimer	"	4,00	"	1,58	"	1,14	"
Armour	"	4,32	"	1,40	"	1,39	"

B. - Lécithine cadmique

Avant d'exposer l'étude analytique de la lécithine cadmique, nous allons en donner les méthodes de préparation et de purification.

A) Préparation et Purification de la lécithine cadmique

Nos expériences ont porté sur des lécithines commerciales, qui n'avaient subi que des purifications industrielles et renfermaient encore une certaine quantité d'impuretés. Il nous a semblé indispensable à titre de vérification de répéter certaines de nos expériences sur des échantillons purifiés. Nous avons donc cherché à obtenir à partir de ces lécithines, les produits possédant un plus grand degré de pureté.

La simple précipitation d'une solution éthérée de lécithine par l'acétone ne semble pas être un moyen très sûr d'obtenir une pureté absolue.

Pour la lécithine d'oeuf nous avons préféré le passage par la lécithine cadmique. La totalité de l'opération peut se décomposer en trois stades principaux :

- Obtention de la lécithine cadmique

- Purification de la lécithine cadmique

- Obtention de lécithine purifiée à partir de la lécithine cadmique purifiée (voir chapitre VI, A, page 89).

Obtention de la lécithine cadmique

L'addition d'une solution de chlorure de cadmium dans le méthanol absolu à une solution alcoolique de lécithine, amène la formation d'un précipité blanc abondant se déposant très vite, qui est de la lécithine cadmique, séparable facilement par filtration. La lécithine cadmique est d'un blanc jaunâtre, elle est un complexe de lécithine et de chlorure de cadmium.

Nous l'avons préparée selon la technique que de Levene et Rolf [19]

Réactifs

1) Solution de lécithine :

Lécithine d'oeuf	10 g
Ethanol absolu	100 cm3

Cette solution est placée 24 h. à la glacière et décantée pour la séparer du dépôt adhérent aux parois.

2) Solution de chlorure de cadmium :

Chlorure de cadmium par anhydre	3 g
Méthanol absolu	140 cm3

Nous avons désséché le chlorure de cadmium à l'étuve à 100° jusqu'à poids constant.

On porte à l'ébullition un temps suffisant pour assurer la dissolution, mais il reste toujours un léger résidu blanc insoluble, on filtre à chaud et on utilise la solution dès qu'elle est refroidie aux environs de 25-30°.

Technique

On amène la solution de lécithine à 250 cm3 avec de l'éthanol absolu et on y verse lentement et en agitant la solution cadmique. Il se forme un précipité blanc qui se dépose rapidement. On garde un peu de solution cadmique pour vérifier que la précipitation a été complète. On filtre sur un Büchner à l'aide du vide et on lave très soigneusement à l'alcool absolu jusqu'à disparition totale de l'ion chlore dans les liquides de lavage.

Le précipité blanc-jaunâtre ainsi obtenu est aussitôt porté dans un dessiccateur et est desséché sous le vide sulfurique. Il garde ainsi sa teinte originelle, alors que conservé à l'air il brunit assez vite tout au moins en surface.

Ce passage par la combinaison cadmique amène dans les lécithines commerciales une élimination des céphalines qui ne donnent pas de complexe cadmique. Une partie de ces céphalines avait déjà été éliminée par leur insolubilisation dans la solution alcoolique de lécithine, puisque les céphalines sont insolubles dans l'alcool absolu, mais malheureusement se dissolvent plus ou moins dans les solutions alcooliques de lécithine.

Purification de la lécithine cadmique

Levene et Rolf [19] ont proposé un procédé de purification de la lécithine cadmique par lavages à l'éther. M.C. Pangborn [20,21] propose une méthode basée sur les différences de solubilité de la lécithine cadmique dans l'éther de pétrole et l'alcool éthylique à 80 p. 100. La lécithine cadmique est insoluble dans l'éther de pétrole, peu soluble dans l'éthanol à 80 p. 100; par contre elle est soluble dans l'éthanol à 80 p. 100 saturé d'éther de pétrole, et se sépare quand on élimine ce dernier.

Pour purifier le sel de cadmium de la lécithine nous avons employé cette méthode modifiée quelque peu dans sa partie technique par P. Fleury.

Réactifs

1) Ether de pétrole Prolabo type dit "chemin de fer" rectifié P.E. 35-50°

2) Alcool absolu

Technique

5 g de lécithine cadmique sont soigneusement délayés au mortier avec de faibles volumes du mélange :

Ether de pétrole	100 cm3
Alcool absolu	160 cm3

Le mortier est finalement rincé avec le reste de la solution éthéro-alcoolique et le tout est introduit dans une ampoule à décantation. On agite pendant 5 minutes, on a une suspension opaque, on ajoute alors 40 cm3 d'eau distillée petit à petit, la solution s'éclaircit complètement, on agite alors vigoureusement pendant 5 minutes et on laisse au repos.

L'addition d'eau amène à 80 p. 100 le titre de l'alcool introduit précédemment, cette addition ultérieure d'eau est préférable à l'utilisation directe d'alcool à 80 p. 100 préconisée par Mary Pangborn, car elle évite toute trace d'émulsion et provoque quasi instantanément la formation de deux couches bien distinctes. Le repos d'une nuit est grandement suffisant, alors qu'avec la technique originale il faut attendre bien plus longtemps.

Après repos dans l'ampoule à décantation nous obtenons :

-une couche inférieure alcoolique, la plus importante, jaune clair; qui est décantée et mise de côté.

- une couche supérieure éthérée brune.

La solution éthérée brune est alors soumise à un nouvel épuisement par 15 cm3 d'alcool à 80 p. 100 dans les mêmes conditions que précédemment. La solution alcoolique est mise de côté. On recommence ces épuisements encore deux fois. Ces opérations s'effectuent comme la première fois, mais on note la formation dans la couche éthérée d'un réseau brunâtre très adhérent au verre de l'ampoule, qui finit par se condenser en un disque visqueux, dont la formation devient de plus en plus lente au cours des derniers épuisements.

La précipitation de la lécithine cadmique est très facile : il suffit de volatiliser l'éther de pétrole qui sature l'alcool à 80 p. 100 : la solution alcoolique est introduite dans un ballon obturé par un bouchon à 2 trous. Par un des trous un tube de verre relie le ballon à la trompe à vide, tandis que le deuxième trou permet d'introduire dans la solution une canne de verre dont l'extrémité aplatie est perforée de petits trous disposés en couronne permettant une grande diffusion de l'air dans la solution. Le passage du courant d'air provoque l'insolubilisation de la lécithine cadmique, qui précipite en flocons blancs par suite d'une part de l'évaporation de l'éther de pétrole et d'autre part de l'abaissement du titre de la solution alcoolique. La solution alcoolique reste colorée en jaune. On recueille la lécithine cadmique (cette partie de lécithine cadmique sera appelée L.) sur filtre en verre poreux G3, on lave à l'alcool à 80 p. 100. On s'assure que la précipitation est bien terminée en vérifiant qu'un courant n'amène plus aucun trouble et que l'addition d'eau (volume triple de la solution alcoolique) ne trouble pas. Ce système de vérification est également employé lors des épuisements éthéro-alcooliques dans l'ampoule à décantation.

Dans certaines de nos expériences, ce liquide ainsi débarrassé de tout ce qui est précipitable par un courant d'air, a été recueilli et distillé à sec à basse température. Nous avons ainsi recueilli une lécithine cadmique de second jet (L 2) que nous avons aussi étudiée.

Bilan de la purification

Nous donnons ici le bilan d'une de nos purifications de la lécithine cadmique par cette méthode.

Nous avions mis en oeuvre 5 g de lécithine cadmique :

Lécithine cadmique retirée du 1er alcool d'épuisement	2,690 g	3,442
Lécithine cadmique retirée des 3 alcools d'épuisement suivants	0,752 g	
Matière brune	0,548 g	
Extrait sec de l'éther de pétrole	0,050 g	
	4,040 g	

La matière brune est évaluée avec quelque perte étant donné sa forte adhérence aux parois de l'ampoule.

Le rendement en lécithine cadmique purifiée à partir de la lécithine cadmique brute est de 3,442 g pour 5 g soit 68,8 p. 100. Il est loin d'être toujours aussi favorable.

Ce bilan montre que c'est le premier alcool d'épuisement qui contient la majeure partie de la lécithine cadmique purifiée (78,1 p. 100). Pour préparer la lécithine cadmique qui nous a servi à obtenir la lécithine pure, nous nous sommes borné à deux extractions alcooliques par suite du très faible rendement des extractions ultérieures.

B) Etude de la lécithine cadmique

Sur la lécithine cadmique obtenue et purifiée comme nous venons de l'indiquer, nous dosons le phosphore, l'azote et le cadmium par les méthodes usuelles. Nous donnons les chiffres trouvés dans des lécithines d'origines différentes.

Origine	Phosphore		Azote		Rapport N/P en atomes		Cadmium	
	P p. 100	P théorique	N p. 100	N théorique	trouvé	théorique	Cd p. 100	Cd théorique
R.P.	2,84	3,12	1,37	1,43	1,06	1,00	10,96	11,3
R.P.	2,87	3,12	1,32	1,43	0,97	1,00	10,92	11,3
Merck (All.)	2,87	3,12	1,30	1,43	1,00	1,00	11,0	11,3

CHAPITRE III

ETUDE DE L'HYDROLYSE

I. - MISE AU POINT DES DIVERS STADES DE LA TECHNIQUE

Notre travail a consisté à étudier l'hydrolyse alcaline en milieu alcoolique et à température peu élevée d'une solution de lécithine en suivant en fonction du temps la libération progressive des divers constituants de ce phosphatide : acides gras, choline, glycérophosphate.

1 - Conditions d'hydrolyse d'une solution alcoolique de lécithine

Nous partons d'une solution de lécithine d'oeuf à 10 p. 100 dans l'alcool méthylique absolu obtenue comme précédemment, dont on détermine la teneur exacte en lécithine par un extrait sec. On connaît également la teneur en phosphore et en azote de la solution. Nous hydrolysons un volume connu de cette solution par de la lessive de potasse à 30 p. 100 (le dixième en volume de la solution de lécithine) ce qui fait une concentration voisine de la normalité. (Nous avons utilisé la potasse de préférence à la soude, car les savons de soude amènent une gélification compacte du milieu entravant complètement le prélèvement).

Lors de nos premières expériences nous avons fait l'hydrolyse à la température du laboratoire, il nous a paru par la suite plus logique, vu l'importance considérable de la température sur la vitesse d'hydrolyse, de la réaliser à température constante, à l'étuve à 34-35°. Cette deuxième technique présente en outre un avantage net sur la première : au cours de l'hydrolyse à 34-35° le liquide reste toujours parfaitement limpide alors que, au cours d'une hydrolyse à la température ambiante, on observe la formation de savons plus ou moins gélatineux qui gênent considérablement les prélèvements à effectuer.

Pour cette partie de notre travail Mlle L. Joly a bien voulu nous apporter le concours de son habileté expérimentale. Nous lui en exprimons ici nos sincères remerciements.

2 - Indice de saponification

La première détermination consiste à suivre par titration à la phtaléine la quantité de potasse qui disparaît progressivement au fur et à mesure de l'hydrolyse de la lécithine mise en oeuvre. Une solution témoin contenant une proportion de potasse dans le méthanol semblable à celle de la solution de lécithine employée est titrée par l'acide sulfurique normal en présence de phtaléine, en utilisant une prise d'essai identique à celle de la solution étudiée, soit : n cm3.

A des temps convenablement espacés on mesure dans des petits cristallisoirs des prises d'essai de la solution de lécithine hydrolysée, et après addition de phtaléine on titre par l'acide sulfurique normal jusqu'à décoloration, soit n' cm3 le nombre de centimètres cubes versés, la différence n-n' cm3 représente le volume de solution normale de potasse consommée par la quantité de lécithine contenue dans la prise d'essai (indice de saponification).

Comme après cette première opération qui amène la neutralisation du milieu, on désire extraire les acides gras libérés, il est nécessaire d'acidifier. Nous avons opéré de deux manières différentes.

Dans nos premières expériences la prise d'essai neutralisée à la phtaléine était additionnée d'un volume complémentaire n'' cm3 d'acide sulfurique normal, correspondant au volume de potasse consommée n-n' . Autrement dit, la somme des deux volumes n'+n'' correspond au volume n de potasse mise en oeuvre au début de l'expérience.

Nous avons plus tard réalisé cette acidification en continuant la titration par l'acide sulfurique normal n'' cm3 jusqu'au virage au jaune du vert de bromocrésol (pH 4,5), ce qui comme l'expérience l'a montré revient à peu près au même.

La solution où les acides gras sont à l'état d'acides libres est alors portée à l'étuve à 50° pour évaporation à sec. Le résidu sec est prêt pour l'extraction des acides gras.

3 - Extraction des acides gras

Avant d'utiliser la technique définitive d'extraction au benzène, nous avons essayé comme solvants l'éther de pétrole et l'éther sulfurique.

Nous nous sommes servi d'éther de pétrole Prolabo (type dit "chemin de fer") que nous avons rectifié, (point d'ébullition entre 35-50°), après avoir vérifié sa neutralité. Le contenu des cristallisoirs était repris par l'éther de pétrole et versé quantitativement dans des tubes à centrifuger, le culot était épuisé plusieurs fois de suite et l'ensemble des fractions éthérées d'extraction était titré par la potasse méthylique N/10 en présence de phtaléine. En fait cette extraction était très difficile par suite de la formation de plusieurs couches liquides surnageant le culot. Nous avons tenté d'obvier à cet inconvénient par l'addition de substances déshydratantes: le sulfate de sodium desséché et le plâtre. L'un comme l'autre, s'ils donnèrent des résultats assez favorables, présentaient de tels inconvénients que nous avons dû les rejeter. Le sulfate de sodium desséché devait être utilisé en telle proportion que l'extraction devenait plus difficile et nécessitait trop de solvant, par ailleurs l'excès de sulfate de sodium était entraîné dans les opérations ultérieures et devenait gênant. Une petite quantité de plâtre suffisait pour donner une pâte extractible, mais il se prenait souvent en masses dures que l'on ne pouvait pas épuiser plusieurs fois. Au cours de ces expériences nous avons essayé de voir si par acidification du résidu du cristallisoir par l'acide sulfurique N/1 et 10 N nous obtenions une libération plus grande d'acides gras, nos essais montrèrent qu'il n'en était rien.

Nous pensons que les difficultés que nous avons rencontrées avec l'éther de pétrole qui est cependant un excellent solvant des acides gras proviennent de l'insolubilité de la lécithine dans ce solvant, cette cause jouant particulièrement au moment où la saponification était incomplète.

D'autre part, l'éther sulfurique donne des émulsions et par ce fait est à rejeter.

Le benzène, par contre, nous a paru donner les meilleurs résultats. L'extraction peut se faire à froid ou à l'ébullition, les chiffres d'acides gras trouvés par les deux méthodes sont identiques.

Si l'on opère à froid, on reprend le contenu des cristallisoirs par du benzène dont on s'est assuré de la neutralité et qui a été soigneusement rectifié. On recueille quantitativement le résidu dans un tube à centrifuger, on agite pendant quelques minutes pour faciliter l'extraction, on fait ainsi dans le tube à centrifuger même, environ trois épuisements; au bout de trois épuisements on ne trouve plus de trace d'acidité.

A chaud l'extraction se fait en versant le benzène dans le cristallisoir que l'on porte sur un bain-marie jusqu'à ébullition du benzène et on recommence plusieurs fois après de nouvelles additions de benzène jusqu'à ce qu'il ne soit plus coloré ou acide. Les différentes fractions benzéniques sont réunies et centrifugées.

En opérant à froid comme à l'ébullition on obtient finalement :

a - un culot épuisé par le benzène que l'on met à dessécher à l'étuve à 50°. Il contient la choline et la plus grande partie du phosphore qui est alors à l'état hydrosoluble. Son étude est poursuivie plus loin au paragraphe 4 (page 50).

b - une solution benzénique.

Cette solution benzénique qui contient tous les acides gras peut éventuellement renfermer -tout au moins lorsque la saponification n'est pas encore complète- de la lécithine et aussi le cas échéant des principes solubles non saponifiés.

Titrage de l'acidité

La quantité d'acides gras contenus dans la prise d'essai de lécithine mise en oeuvre est déterminée simplement par titration de leur acidité, réalisée par dosage volumétrique au moyen de la potasse méthylique N/10 en présence de phtaléine, dont le virage est très net.

Etude de la solution benzénique

La solution alcoolo-benzénique ainsi neutralisée, dans laquelle par conséquent les acides gras sont à l'état de savons de potasse, est transvasée quantitativement dans un cristallisoir et mise à évaporer à l'étuve à 50°. Pour nous rendre compte qu'il existe dans ce milieu autre chose que des savons, ce que nous appelons l'insaponifié, le résidu d'évaporation est épuisé à chaud par le benzène. Après centrifugation nous avons :

- une solution benzénique de l'insaponifié

- un culot constitué par les savons potassiques des acides gras.

La solution benzénique de l'insaponifié est évaporée à 50° dans un cristallisoir taré, le résidu est pesé. Pour permettre l'établissement du bilan de phosphore le résidu est remis en solution dans le benzène, le phosphore y est dosé après destruction nitrico-magnésienne.

Pour la même raison, le culot de savons est dissous dans l'eau et on y dose le phosphore.

4 - Extraction de la choline

Le culot débarrassé des acides gras par le benzène est desséché et épuisé par l'éthanol absolu à chaud.

Cet épuisement a été réalisé au cours de ce travail de deux manières :

Lorsque nous avions de grandes quantités à traiter nous utilisions de préférence l'épuisement au Kumagawa. Le résidu d'évaporation était recueilli quantitativement sur du coton hydrophile. Après dessication , il était imbibé d'alcool absolu, et était introduit dans la cartouche d'un Kumagawa. L'épuisement se faisait sur un bain-marie bouillant par l'alcool absolu.

Si le produit à traiter est en quantité relativement faible, l'épuisement peut se faire plus simplement en portant sur un bain-marie bouillant le résidu d'évaporation que l'on traite à plusieurs reprises par l'alcool absolu jusqu'à ébullition, en laissant l'ébullition se poursuivre chaque fois 5 à 10 minutes. On réunit les alcools d'épuisement

A la fin de l'une et l'autre de ces opérations on a donc d'une part une solution alcoolique et de l'autre une partie insoluble constituée en grande partie par du sulfate neutre de potassium.

A) Traitement de la solution alcoolique

La solution alcoolique est tout d'abord amenée à un volume connu, que l'on divise en deux parties.

a) Dosage de la choline

On traite une des deux parties par un excès de sel de Reinecke, la choline précipite, le culot de Reineckate de choline peut être soit pesé soit dosé colorimétriquement après dissolution dans l'acétone. Parfois on peut constater qu' aux premiers

stades de l'hydrolyse, une partie du précipité est insoluble dans l'acétone.

b) Etude du phosphore sous ses différentes formes

La deuxième partie de la solution alcoolique est utilisée pour connaître la teneur en phosphore et sous quelle forme se trouve cet élément. On évapore la solution alcoolique dans un cristallisoir taré, on pèse le résidu. On le reprend par l'eau, on étend à un volume connu et sur la solution aqueuse obtenue, on fait dans diverses conditions des dosages de phosphore. On peut également pratiquer ces dosages sur la solution alcoolique directement.

- Phosphore total

Il est déterminé par la méthode habituelle.

Phosphore libéré par hydrolyse à pH 4,1

Ce dosage est fait selon la technique indiquée page 9 sur la solution hydrolysée 24 heures à 120° ou 48 heures à 110°. Nous admettons que cette fraction représente le phosphore glycérophosphotique, tout au moins dans sa plus grande part.

Phosphore libéré par "double hydrolyse"

L'expérience nous ayant montré que l'application de la méthode d'hydrolyse précédente ne nous donne qu'une faible partie du phosphore total, nous avons fait précéder cette hydrolyse à pH 4,1 d'une autre hydrolyse en milieu acide normal; c'est ce que nous appelons la méthode de "double hydrolyse". La solution où l'on veut doser le phosphore est additionnée de un dixième de son volume d'acide chlorhydrique officinal (voisin de 10 N), la solution est ainsi environ normale. Nous portons une heure dans un bain-marie bouillant, la solution est alors amenée à pH 4,1 et est traitée comme les solutions pour la détermination du phosphore glycérophosphorique.

Nous obtenons ainsi des chiffres de phosphore qui proviennent du glycérophosphate, mais aussi et pour la plus grande part de la libération de phosphore par hydrolyse à pH 0 pendant une heure d'un composé phosphoré autre que glycérophosphate, et qui par cette hydrolyse engendre en milieu acide normal du glycérophosphate, d'où le nom que lui a donné Mr. P. Fleury : "glycérophosphatogène"; pour simplifier l'écriture nous le désignerons dans la suite par les lettres GPG. La différence entre le chiffre de phosphore trouvé par "double

hydrolyse" et celui trouvé par simple hydrolyse représente donc en première approximation la quantité de phosphore appartenant au G.P.G.

B) Traitement de la partie insoluble dans l'alcool absolu

La partie insoluble dans l'alcool absolu à chaud donne facilement une solution aqueuse que lon amène à un volume déterminé.

On y dose l'azote.

On y dose le phosphore comme dans la solution alcoolique :

- Phosphore total
- Phosphore libéré par "double hydrolyse"
- Phosphore libéré par hydrolyse à pH 4,1

RESULTATS

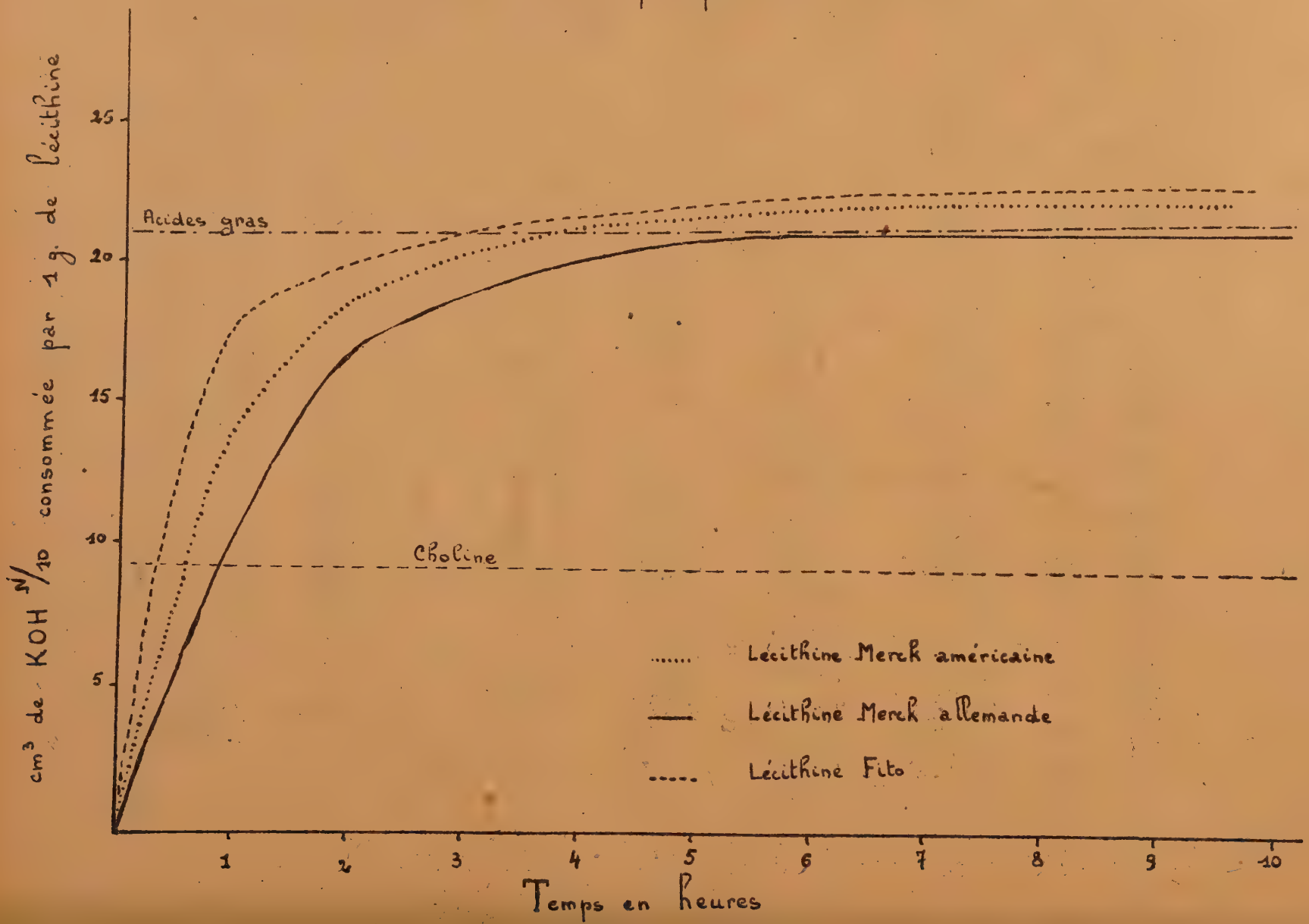
De nombreux tâtonnements ont été nécessaires pour établir les conditions exactes d'une expérience correcte. Nous n'en reproduisons ici que quelques expériences choisies parmi celles qui nous ont été les plus utiles pour orienter nos recherches.

A) Hydrolyse alcaline. Indice de saponification

Nous donnons ici les résultats que nous avons obtenus lors d'hydrolyses de lécithines différentes faites en fonction du temps à la température du laboratoire.

Nous reproduisons tout d'abord (graphique I) les courbes d'hydrolyse de solutions méthyliques de lécithine traitées par de la lessive de potasse à la température du laboratoire pendant une durée de huit à neuf heures. En abscisses nous portons les temps d'hydrolyse en heures, en ordonnées les volumes de potasse consommée par un gramme de lécithine (n-n') cm3 exprimés en centimètres cubes de solution de potasse N/10. Nous reproduisons les courbes obtenues avec la lécithine Fito, la lécithine Merck d'origine allemande et la lécithine Merck d'origine américaine.

Graphique 1


cm³ de KOH N/10 consommée par 1 g. de lécithine
25
20
15
10
5
Acides gras
Choline
Lécithine Merck américaine
Lécithine Merck allemande
Lécithine Fito
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
Temps en heures

Sur ce graphique nous voyons que les allures des trois courbes sont les mêmes pour des lécithines d'oeuf d'origine différentes, les légères divergences observées peuvent être attribuées soit aux écarts de température à laquelle les hydrolyses ont été faites, soit aux impuretés contenues dans les lécithines ou même aux deux causes réunies.

Le graphique 2 représente une hydrolyse de lécithine Fito en solution méthylique à la température du laboratoire pendant 42 jours. Sur cette courbe les temps portés en abscisses sont exprimés en heures, mais par commodité ils sont disposés en progression géométrique de raison 2. Cette solution a continué à être hydrolysée pendant 34 mois, et la quantité de potasse N/10 consommée a été indiquée comme chiffre maximum obtenu. Par ailleurs dans l'espoir d'obtenir le chiffre de potasse consommée par une hydrolyse totale, nous avons prélevé à la 20ème heure d'hydrolyse, après homogénéisation du milieu une prise d'essai que nous avons portée en ampoules scellées à l'étuve à 100°. Nous titrons l'acidité apparue au bout de 1, 2, 4, 24 heures de cette nouvelle hydrolyse.

On voit que l'hydrolyse à froid commence très rapidement, surtout pendant la première heure, la vitesse décroît légèrement pendant les trois heures suivantes, elle se ralentit sensiblement de la 4ème à la 8ème heure et semble n'augmenter qu'insensiblement jusqu'à la 40ème heure.

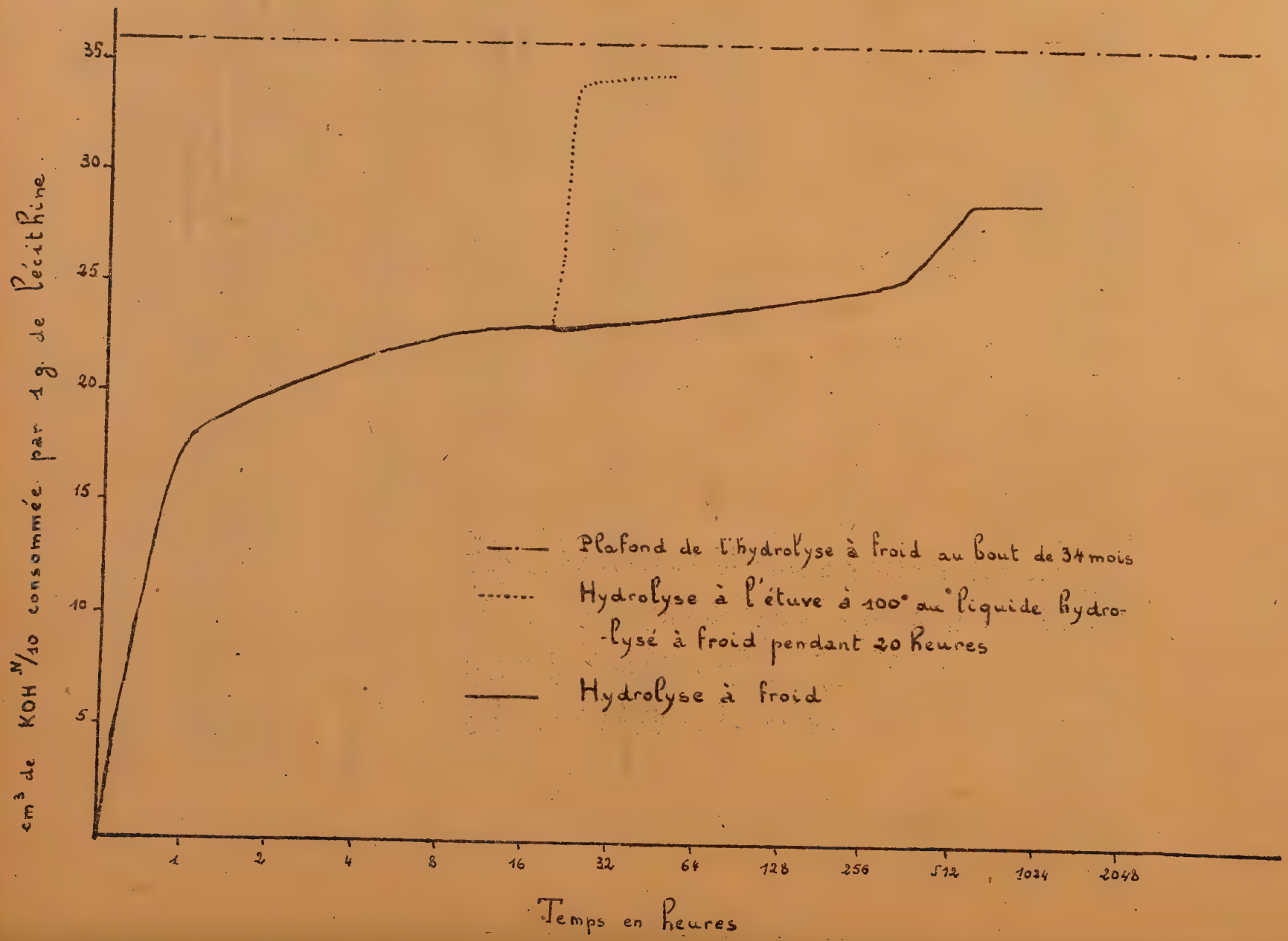
A l'étuve à 100°, la vitesse d'hydrolyse est fortement augmentée, en 4 heures elle atteint presque son maximum, et le volume de potasse consommée en 24 heures s'approche très sensiblement du chiffre obtenu lors de l'hydrolyse à froid de 34 mois (34,6 cm3 de KOH N/10 au lieu de 35,9).

On peut en conclure que l'hydrolyse à froid de la lécithine d'oeuf en solution méthylique n'est complète à froid qu'au bout de plusieurs mois, et en 4 à 5 heures à 100°. Mais le fait le plus remarquable est que cette hydrolyse se fait à froid en plusieurs stades :

- un premier stade très rapide, qui, comme nous le verrons, correspond à la libération des acides gras.

- un deuxième stade beaucoup plus lent, qui, comme nous le verrons également plus loin, ne paraît pas lié à la libération de la choline.

Graphique 2


35
30
25
20
15
10
5
cm³ de KOH N/10 consommée par 1 g. de Lécithine
1
2
4
8
16
32
64
128
256
512
1024
2048
Temps en heures
Plafond de l'hydrolyse à froid au bout de 34 mois
Hydrolyse à l'étuve à 100° au liquide hydrolysé à froid pendant 20 heures
Hydrolyse à froid

B) Extraction des acides gras

L'épuisement par le benzène de la lécithine hydrolysée donne une solution d'acides gras libres (puisque le résidu a été acidifié de manière à détruire les savons). Leur titration, comme nous le verrons plus loin, montre que leur quantité n'augmente plus au bout de deux heures; les acides gras sont donc totalement libérés dès la deuxième heure de l'hydrolyse.

Théoriquement une molécule de lécithine renferme 2 molécules d'acides gras, dans ces conditions, pour une lécithine pure, un gramme de ce produit libérerait 24,8 cm3 N/10 d'acides gras.

Nous n'avons jamais obtenu ce chiffre théorique. Dans le tableau ci-dessous nous donnons différents résultats trouvés avec une même lécithine ou des lécithines différentes, tous les chiffres sont calculés pour 1 gramme de lécithine.

Lécithine	acide gras cm3 N/10	Lécithine	acide gras cm3 N/10
Merck américaine	19,2	Fito	21,1
	19,8		22,2
	18,6		20,9
Merck allemande	21,2	Eimer	21,6
	20,7		21,2
	20,5		19,8
		Armour	22,3

La teneur en acides gras des différentes lécithines d'oeuf, que nous avons utilisées, est donc à peu près constante.

C) Etude des diverses formes du phosphore

Nous avons au cours de nombreuses hydrolyses étudié la teneur en phosphore des différentes fractions de l'hydrolyse et aussi sous quelle forme se trouve cet élément, en utilisant les techniques exposées plus haut, qui permettent de déterminer le phosphore total après destruction nitrico-magnésienne, le phosphore glycérophosphorique après hydrolyse à pH 4,1, et le phosphore sous forme de GPG après "double hydrolyse".

Une solution méthylique de lécithine Fito est hydrolysée par la lessive de potasse pendant 8 heures à la température du laboratoire. L'hydrolysat est additionné d'acide sulfurique en quantité suffisante pour neutraliser la potasse introduite, puis mis à évaporer à l'étuve à 37°. Le résidu d'évaporation est ensuite épuisé par le benzène, qui extrait les acides gras libérés, la partie insoluble dans le benzène est mise à sécher à l'étuve à 37°. Le nouveau résidu insoluble dans le benzène est épuisé par l'eau. Il y est totalement soluble. Dans la solution aqueuse (solution 1) nous dosons les constituants : azote et phosphore. De cette solution nous précipitons la choline par l'acide silicotungstique. Le précipité de silicotungstate de choline est séparé par centrifugation, le liquide surnageant est mis à évaporer à l'étuve à 37°.

Le résidu d'évaporation est ramassé quantitativement sur un coton hydrophile, qui est alors introduit dans la cartouche d'un Kumagawa. L'épuisement est fait à l'éthanol absolu, le Kumagawa étant porté sur un bain-marie bouillant pendant 2 heures. On peut alors étudier deux fractions :

- Fraction soluble dans l'alcool absolu

Cette fraction se trouve dans l'alcool d'épuisement; nous faisons un extrait sec sur cette solution (solution 2). Nous dosons l'azote et le phosphore.

- Fraction insoluble dans l'éthanol absolu

Cette fraction se trouve dans le coton épuisé à l'alcool. Le coton est alors épuisé par l'eau distillée(solution 3). Cette solution sert à la détermination d'un extrait sec, et au dosage de l'azote et du phosphore.

Nos résultats sont rapportés dans le tableau :

Phosphore en mg rapporté à 1 g de lécithine			
	Solution aqueuse non fractionnée (solution 1)	Fraction soluble dans l'alcool (solution 2)	Fraction insoluble dans l'alcool (solution 3)
P après "double hydrolyse"	23,5	15,1	2,7
P après simple hydrolyse	8,0	1,0	2,3

La comparaison des valeurs obtenues par les deux techniques d'hydrolyse sur la solution aqueuse non fractionnée (solution 1) montre d'une façon indubitable qu'une très grande partie du phosphore n'existe pas sous forme de glycérophosphate, mais sous forme de glycérophosphatogène (GPG).

Ce résultat est confirmé par le fractionnement de cette solution par l'alcool absolu. C'est dans ce solvant que le GPG se retrouve, tandis que dans la fraction insoluble dans l'alcool le phosphore est presque complètement sous forme de glycérophosphate, cette conclusion résulte de la comparaison entre les deux techniques d'hydrolyse, qui donnent d'ailleurs deux chiffres très voisins.

Des résultats du même ordre ont été obtenus avec nos autres échantillons de lécithine. Nous croyons inutile de les rapporter ici. Mais dans nos premières expériences avec 8 heures d'hydrolyse à froid, l'étude de la répartition de l'azote ne tarda pas à nous montrer que, malgré l'élimination de la choline libérée, nous retrouvions constamment dans notre fraction alcoolo-soluble une quantité non négligeable d'azote résistant à toute séparation. Ce fait nous a amené à étudier l'état de la choline dans nos solutions.

D) Etat de la choline

Au début de nos expériences nous avions pensé que l'hydrolyse de la lécithine d'oeuf était pratiquement terminée au bout de 8 heures, la courbe d'hydrolyse nous l'avait laissé supposer, nous arrêtions donc nos hydrolyses au bout de ce temps. Le dosage de la choline était fait sur la solution alcoolique ou aqueuse du résidu après extraction des acides gras. Nous précipitions alors la choline par l'acide silico-tungstique ou mieux par le sel de Reinecke. Sur le filtrat obtenu nous retrouvions alors toujours une quantité importante d'azote, et nous étions loin d'obtenir le chiffre théorique de choline. Nous avons alors pensé que la choline au bout de 8 heures n'était pas entièrement directement précipitable, et nous avons pu vérifier cette hypothèse en mettant en évidence de la choline combinée dans notre fraction alcoolique.

De la solution alcoolique de l'hydrolysat dont nous avons extrait les acides gras, nous précipitons la choline par le sel de Reinecke, nous séparons le précipité par centrifugation. Nous débarrassons le liquide surnageant de l'excès de sel de Reinecke qu'il contient : la solution est traitée par un excès de sulfate d'argent (solution aqueuse à 1,5 p. 100 à chaud), nous éliminons l'excès de sulfate par une solution de chlorure de baryum à 10 p. 100, et l'excès de baryum par une solution de sulfate de potassium. Après ces traitements successifs la solution obtenue, ne contenant donc plus de choline libre, est réduite à son volume initial au bain-marie. Elle est alors hydrolysée en milieu acide normal par addition du dixième de son volume d'acide chlorhydrique 10 N pendant une heure par immersion dans un bain-marie bouillant. Après refroidissement l'addition d'une solution de sel de Reinecke donne lieu à un précipité de Reineckate de choline. Celle-ci a donc été libérée au cours de l'hydrolyse acide, montrant que dans nos conditions expérimentales primitives la libération de la choline n'était pas complète.

II. DESCRIPTION DE LA TECHNIQUE FINALEMENT UTILISEE.

Après avoir ainsi étudié séparément les différents stades de l'hydrolyse en ce qui concerne les divers constituants libérés, nous avons réalisé une expérience d'ensemble en suivant dans le temps sur une même solution à la fois le sort des acides gras, de la choline, et du phosphore sous ses différentes formes.

Nous sommes parti d'une solution de lécithine dans le méthanol absolu dont nous donnons la composition plus loin. Nous ajoutons à cette solution de lécithine un dixième de son volume de potasse à 30 p. 100, et nous pratiquons l'hydrolyse à l'étuve à 34-35°, cette hydrolyse est donc faite à température constante. Nous faisons des prises d'essai qui nous permettent d'étudier à chaque stade de l'hydrolyse la teneur en chacun des constituants libérés à des intervalles de temps variables, rapprochés au début de l'expérience, puis de plus en plus éloignés au fur et à mesure que la vitesse d'hydrolyse décroît, ces intervalles de temps sont échelonnés entre un quart d'heure et trente jours.

Nous avons utilisé la technique exposée en détail précédemment. Nous rappelons brièvement le schéma qui nous amène aux constituants que nous avons dosés.

1) Indice de saponification

La potasse, contenue dans le prélèvement est n cm3 exprimée en solution N/10. Le volume de solution de potasse restant est de n' cm3 N/10. La différence n-n' cm3 N/10 représente l'acidité apparue (volume de solution de potasse consommée). n" cm3 sont ajoutés pour amener à un milieu acide convenable (environ pH 4,0 à 4,2).

2) Extraction des acides gras

Elle est obtenue par plusieurs épuisements au benzène à chaud. Par centrifugation nous obtenons :

a - Une solution benzénique d'acides gras.

L'acidité est titrée par la potasse méthylique N/10. La solution ainsi neutralisée est évaporée et à nouveau épuisée par le benzène par centrifugation, nous avons :

- un culot de savons dans la solution aqueuse desquels nous dosons le phosphore.

- une solution benzénique représentant l'insaponifié, dont nous déterminons

-le poids par pesée du résidu d'évaporation,
-la teneur en phosphore total.

b - Un culot de centrifugation qui contient le phosphore hydrosoluble et la choline.

3) Extraction de la choline et étude du phosphore (à partir du culot b -)

Le culot de centrifugation b est épuisé par l'alcool absolu à chaud, nous obtenons une partie insoluble et une solution alcoolique :

I) Sur la solution alcoolique amenée à un volume déterminé, on effectue :

Dosage de la choline colorimétriquement par le Reineckate,

Dosage du phosphore total,

Dosage du phosphore glycérophosphorique par hydrolyse simple à pH 4,1,

Dosage du phosphore par "double hydrolyse" d'abord à pH 0 puis à pH 4,1.

II) Partie insoluble dans l'alcool mais soluble dans l'eau

Dosage du phosphore sous ses trois formes comme ci-dessus.

A. - EXEMPLE D'UN ESSAI COMPLET SUR UN PRELEVEMENT DE 2 cm3.

Nous croyons inutile de donner le détail des multiples dosages exécutés. Nous nous contenterons d'un seul exemple.

La composition de notre solution méthylique de lécithine Merck est la suivante :

Titre de la solution 8,95 p. 100

Phosphore 4,308 mg.par cm3 de solution
(titre 4,72 p. 100 de lécithine)

Azote 1,442 mg par cm3 de solution
(titre 1,61 p. 100 de lécithine)

Elle est additionnée du dixième de son volume de lessive de potasse à 30 p. 100. L'hydrolyse est menée à l'étuve à 34-35°. Nous avons effectué l'ensemble des dosages sur la série des prélèvements de 2 cm3, pratiqués après des temps variables d'hydrolyse.

Nous donnons ci-dessous tous les résultats obtenus sur un prélèvement effectué après 68 heures d'hydrolyse.

1) Indice de saponification

La neutralisation se fait dans un petit cristallisoir sur une prise de 2 cm3, d'abord en présence de phtaléine, puis de vert de bromocrésol; nous atteignons ainsi un pH voisin de 4,0, après avoir utilisé les quantités suivantes d'acide sulfurique normal (lecture sur la microburette des volumes successifs versés).

Décoloration de la phtaléine .....; n' = 0,76 cm3 de solution N

Virage au jaune du vert de
bromocrésol ..... n" = 1,23 cm3 de solution N

Nous avons préalablement titré en présence de phtaléine par l'acide sulfurique normal et sur une prise d'essai de 2 cm3 l'alcalinité d'un mélange de

un volume V de méthanol
un volume V/10 de lessive de potasse à 30 p. 100

ce titrage nous a donné : n = 1,22 cm3 SO_4H_2 N.

Acidité apparue (en solution N/10) pour 1 g. de lécithine :

n - n' = 10 x (1,22 - 0,76) x (1 g. léc.) = 28,27 cm3
n"-n' = 10 x (1,23 - 0,76) x (1 g. léc.) = 28,88 cm3

Pour simplifier l'écriture nous désignerons par l'expression (1 g. léc.) le facteur transformant la quantité de lécithine contenue dans la prise de 2 cm3 de la solution initiale en 1 g. de lécithine.

La prise d'essai ainsi neutralisée est desséchée à l'étuve à 50°.

2) Extraction des acides gras

L'épuisement par le benzène nous donne :

- un culot insoluble (il sera étudié plus loin)

- une solution benzénique sur laquelle nous pratiquons les essais suivants :

A) Titrage des acides gras par la potasse

Le titrage en présence de phtaléine par une solution de potasse méthylique N/10 donne : 3,60 cm3. Ce qui représente 10 x 3,60 x (1 g. léd.) = 22,12 cm3 N/10 pour 1 g de lécithine.

B) Nous évaporons à sec la solution alcoolo-benzénique ainsi neutralisée et pratiquons sur le résidu sec un nouvel épuisement par le benzène selon la technique usuelle. Nous obtenons alors :

- une solution benzénique d'un corps de consistance graisseuse

- un culot constitué par les savons.

a) Etude de la solution benzénique (insaponifié)

Extrait sec :

Poids du résidu	14,5 mg
pour 1 g de lécithine	89,1 mg

Phosphore total :

Sur l'extrait ci-dessus remis en solution dans le benzène qsp 10 cm3 : après destruction nitricomagnésienne de 5 cm3 de cette solution le résidu est repris par l'acide nitrique et l'eau qsp 10 cm3. Nous obtenons 124 μg P_2O_5 pour la totalité de l'insaponifié ce qui représente 0,332 mg. P_2O_5 pour 1 g de lécithine.

b) Etude des savons

Dosage de phosphore (destruction nitricomagnésienne) sur la totalité. Après destruction on amène à 10 cm3.

Lecture photométrique (après dilution au 1/2) 18,2 soit 32,2 μg P_2O_5 ce qui représente :

1,726 mg de P soit 5,57 cm3 de P N/100 pour 1 g de lécithine.

3) Extraction de la choline et étude du phosphore

Le culot insoluble dans le benzène, desséché, est épuisé par l'alcool absolu selon la technique décrite précédemment. Nous obtenons alors :

- un culot insoluble (sulfate de potassium en majeure partie).
- une solution alcoolique que nous amenons à 10 cm3.

A) Etude de la solution alcoolique

a) Dosage de la choline sur 5 cm3 de solution

Technique de précipitation de lavage et de dosage colorimétrique usuelle : dissolution du Reineckate de choline dans 8 cm3 d'acétone. Lecture photométrique : 88,0 soit 8,96 mg de choline base dans la prise d'essai. Choline: 9,17 cm3 N/10 pour 1 g de lécithine.

b) Etude du phosphore sous ses différentes formes

Les 5 cm3 restants de la solution alcoolique donnent un résidu sec de 34,2 mg, soit pour 1 g. de lécithine 419 mg.

Sur le résidu sec amené par l'eau à 10 cm3 nous dosons le phosphore.

- Dosage du phosphore par simple hydrolyse

Solution aqueuse		5 cm3
Solution tampon (pH 4,1)		10 cm3
Eau	qsp	20 cm3

Cette solution est répartie en ampoules scellées, qui sont chauffées à 110° pendant 48 heures.

Lecture photométrique : 20,4 soit 41 µg/cm3 de P^2O^5
ce qui représente pour 1 g de lécithine :

0,437 x 41 x 20 x 2 x 2 x (1 g léc) = 8,840 mg de P ou

2,88 cm3 N/10 (b)

- Dosage du phosphore par "double hydrolyse"

Les 5 cm3 restants de la solution aqueuse sont additionnés de 0,5 cm^3 d'acide chrlohydrique pur. On porte au bain marie bouillant pendant une heure. On ajoute de la soude jusqu'à pH voisin de 4,0 addition de 10 cm^3 de solution tampon, et d'eau qsq 20 cm^3. La solution est répartie en ampoules scellées que l'on chauffe à 110° pendant 48 heures.

Lecture photométrique après dilution au tiers : 21,5
soit 47µg x 3 = 141 µg/cm3 de P_2O_5.

Pour 1 g de lécithine :

0,437 x 141 x 20 x 2 x 2 x (1 g léc) = 30,360 mg P ou
9,79 cm3 N/10.

Rapport a/b = 3,50

B) Etude du culot insoluble dans l'alcool absolu

Le culot insoluble dans l'alcool absolu, presque uniquement composé de sulfate de potassium, est dissout dans l'eau la solution aqueuse est amenée à 10 cm3, et nous y dosons le phosphore.

- Dosage du phosphore par simple hydrolyse

Solution aqueuse		2 cm3
Solution tampon (pH 4,1)		5 cm3
Eau	qsp	10 cm3

Lecture photométrique de la solution après chauffage en ampoules à 120° pendant 24 heures : 13,4 soit 15,2 µg/cm3 de P_2O_5;

pour 1 g de lécithine : 0,437x15,2x10x5x(1 g léc) = 2,042 mg P ou
6,59 cm3 N/100 (b).

- Dosage du phosphore par "double hydrolyse"

Solution aqueuse 1 cm3

Cl H pur 0,1 cm3

On porte au bain- marie bouillant pendant une heure, on neutralise à pH voisin de 4,0, on ajoute 5 cm3 de la solution tampon à pH 4,1, et on complète à 10 cm3 avec de l'eau. On chauffe en ampoules scellées à 120° pendant 24 heures.

Lecture photométrique après dilution au demi :

11,8 soit 10,4 x 2 = 20,8 µg/cm3 de P^2O^5;

Pour 1 g de lécithine :

0,437 x 20,8 x 10 x 10 x (1 g léc) = 5,633 mg P ou 17,98 cm3 N/100 (a).

Rapport a/b = 2,74.

B. - RESULTATS

a) Présentation

Nous avons obtenu les résultats consignés dans le tableau suivant, où pour faciliter les comparaisons tous les résultats sont rapportés à 1 gramme de lécithine primitive et sont exprimés en cm3 de solution N/10 qu'il s'agisse des acides gras, de l'azote, du phosphore, et de la choline. (voir tableau page 67)

Nous présentons également nos résultats sous forme de graphiques sur lesquels on trouvera en ordonnées nos résultats expérimentaux exprimés en cm3 de solution N/10 et en abscisses les temps dont les unités sont en progression géométrique de raison 2.

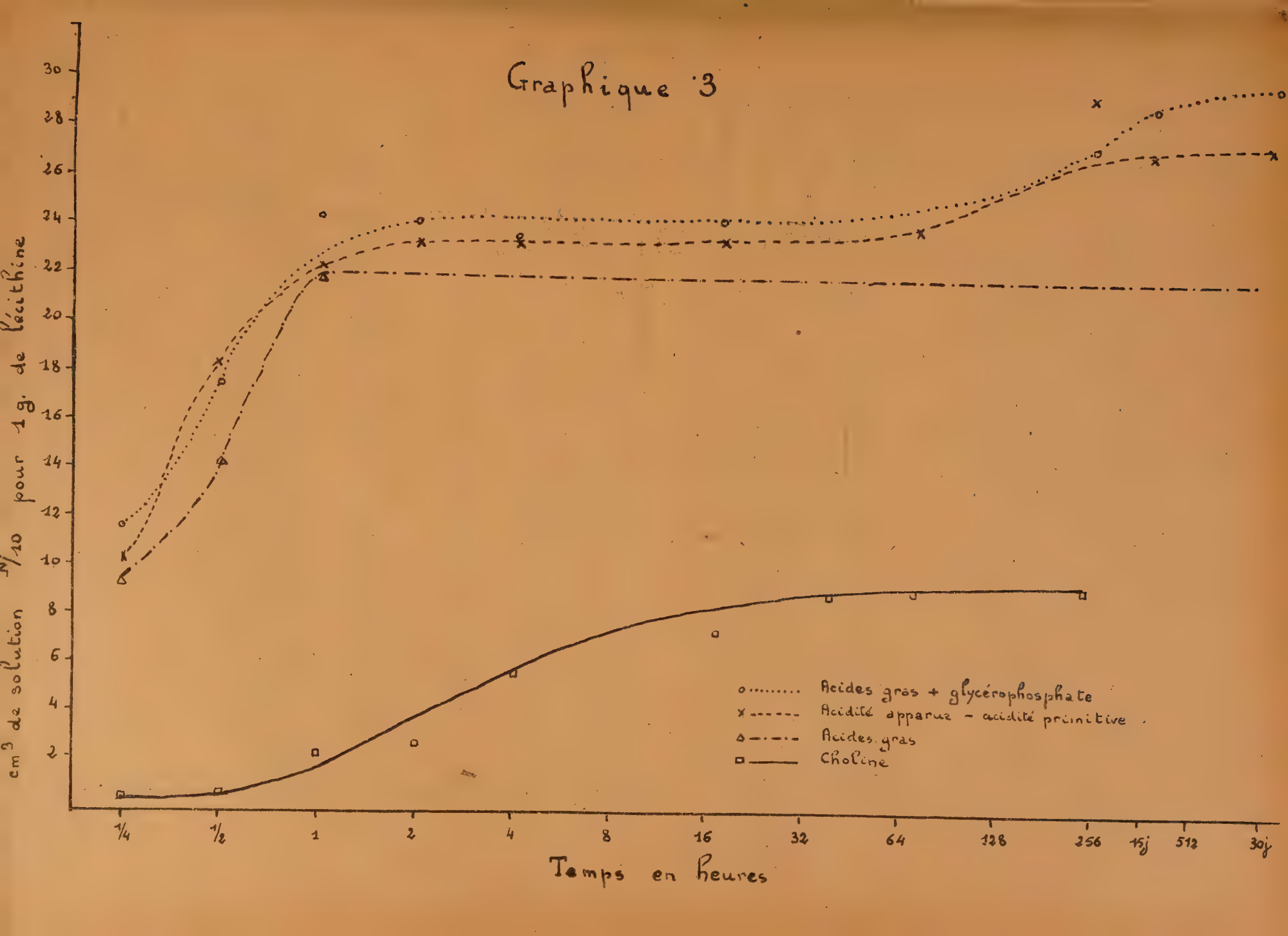
(voir Graphiques 3 et 4)

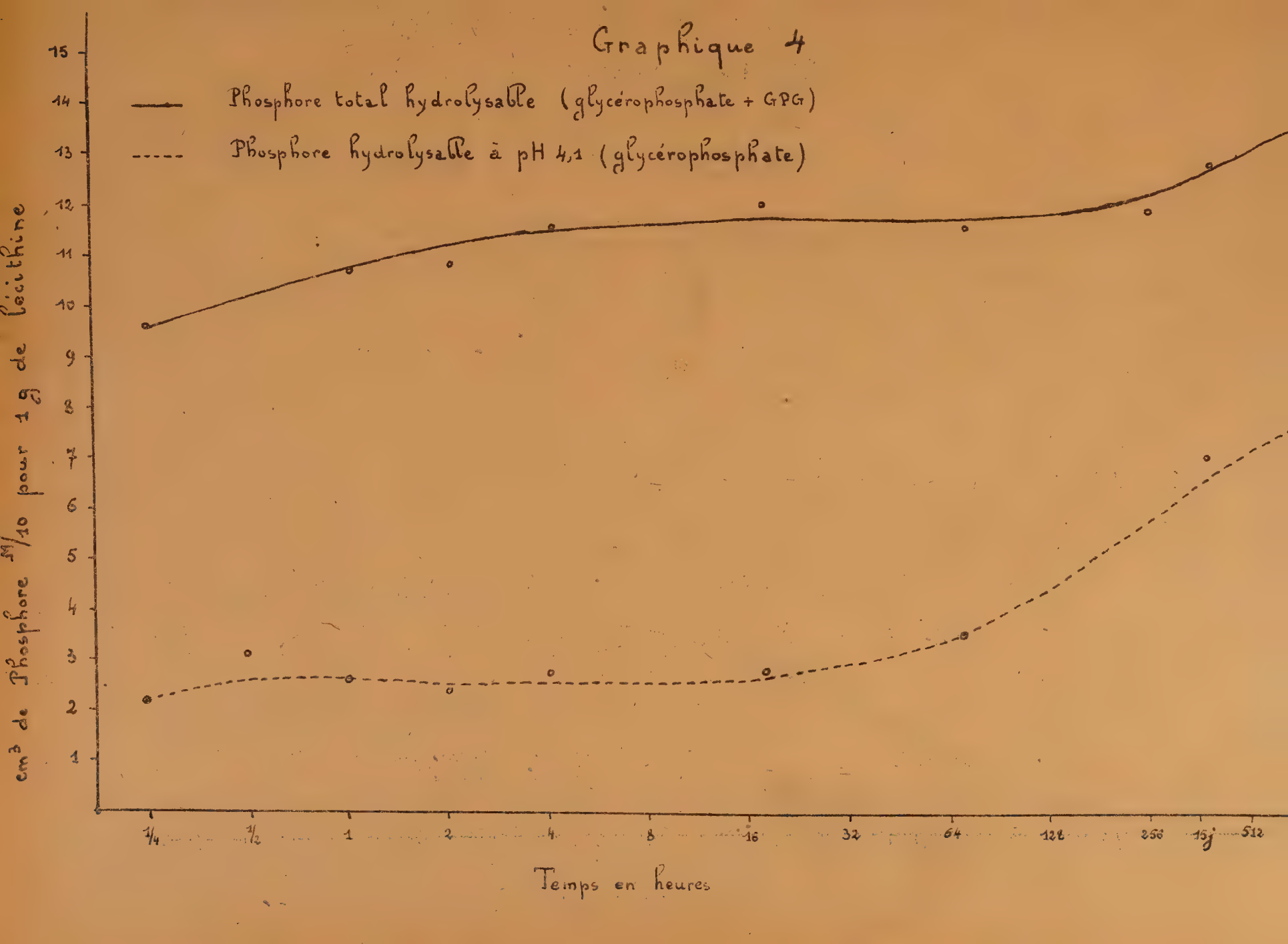
Les diverses courbes traduisent :

1 - Les variations de l'acidité apparaissant par hydrolyse d'après le titrage direct de la solution alcoolique de lécithine.

TABLEAU

Temps	Acidité apparue n - n' en cm3 N/10	n" - n'	Acidité des acides gras en cm3 N/10	Acidité apparue moins Acidité des acides gras en cm3 N/10	Insaponifié Poids en mg	Insaponifié Phosphore en cm3 N/100	Choline base en cm3 N/10	PHOSPHORE Phosphore contenu dans les savons des acides gras cm3 N/100	Phosphore contenu dans la solution alcoolique cm3 N/10 a) après simple hydrolyse à pH = 4.1	b) après "double hydrolyse"	b/a	Phosphore contenu dans la solution aqueuse du culot insoluble dans l'alcool cm3 N/100 a) après simple hydrolyse à pH=4.1	b) après double hydrolyse	b/a
1/4 h	14.14	12.09	9.46	4.68	668.1	11.11	0.41	1.36	2.04	8.84	4.29	1.88	7.40	3.97
1/2 h	22.12	21.50	14.44	7.68	562.9		0.53		3.06			0.86	7.08	8.18
1 h	25.81	25.19	22.12	3.69	409.3	6.56	3.41	4.23	2.33	10.03	4.29	2.77	7.40	2.66
1 1/2 h	26.59	25.99					3.15		1.99	9.39	4.65	1.80	4.37	2.42
2 h	27.20	26.59	22.00	5.20	392,2	6.49	2.98		2.25	10.30	4.68	1.88	5.28	2.80
4 h	27.20	26.59	21.00	6.20	355.8		5.81	4.61	2.60	11.08	4.40	2.15	5.50	2.59
20 h	27.54	26.59	21.69	5.75	296.2	3.01	7.79		2.54	11.29	4.32	2.91	8.16	3.14
24 h	28.82	27.85					8.43		2.47	10.00	4.16			
44 h	29.50	29.49	21.69	7.91	160.4	4.05	9.01	4.08	2.88	10.05	3.57	12.84	15.12.	1.17
68 h	28.27	28.88	22.12	6.16	89.1	1.07	9.17	5.57	2.88	9.79	3.50	6.59	17.98	2.74
8j 20h	33.75	34.41	22.12	11.67	65.7	1.61	9.41	4.81	3.88	9.85	2.57	17.98	20.65	1.14
15 j	31.34	32.57	22.23	9.10	173.1	3.20		4.37	1.92	7.68	4.05	52.64	61.62	1.11
30 j	28.49	39.32	22.23	9.10	103.2	2.25		3.81	2.88	8.84	3.14	52.66	52.66	1.00


Graphique 3
cm³ de solution N/10 pour 1 g. de lécithine
30
28
26
24
22
20
18
16
14
12
10
8
6
4
2
1/4
1/2
1
2
4
8
16
32
64
128
256
15j
512
30j
Temps en heures
Acides gras + glycérophosphate
Acidité apparue - acidité primitive
Acides gras
Choline


Graphique 4
Phosphore total hydrolysable (glycérophosphate + GPG)
Phosphore hydrolysable à pH 4,1 (glycérophosphate)
cm³ de Phosphore M/10 pour 1 g de lecithine
15
14
13
12
11
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
1/4
1/2
1
2
4
8
16
32
64
128
256
15j
512
Temps en heures

2 - Les variations des acides gras libérés (titration de la solution benzénique).

3 - Les variations de la choline libérée.

4 - Les variations du phosphore sous ses deux formes (phosphore glycérophosphorique et phosphore du glycérophosphatogène), on réunit sous le nom de phosphore hydrosoluble les deux fractions qui ne diffèrent que par leur solubilité dans l'alcool absolu

b) Discussion

Avant d'étudier ces graphiques, il importe de faire remarquer que l'interprétation que nous donnons ne porte que sur les 8-10 premiers jours; à partir de cette date, les courbes présentent des variations dont l'interprétation nous échappe, mais qu'il faut à notre avis attribuer à des composés phosphorés plus complexes. Ces composés plus complexes sont peut-être des impuretés, dont la présence dans notre produit n'aurait rien d'étonnant car, pour nous permettre d'opérer sur une masse suffisante de lécithine, nous ne lui avons fait subir qu'une purification sommaire (dissolution dans le méthanol absolu et séjour en glacière).

Il nous parait donc légitime (du moins en première approximation) de prendre comme base de raisonnement le phosphore hydrosoluble glycérophosphorique total existant au bout de 8 jours d'hydrolyse alcaline (il s'agit du phosphore hydrosoluble sous forme aussi bien d'acide glycérophosphorique libre que d'acide glycérophosphorique existant sous forme de GPG). Pour 1 g de notre lécithine, il correspond à environ 12 cm3 de P M/10. On prévoit donc 24 cm3 d'acides gras M/10 et 12 cm3 de choline M/10.

Nous trouvons 22,2 cm3 pour les acides et 9,4 cm3 pour la choline.

1 - Variations comparées de l'acidité libérée, des acides gras libérés et de la choline

Le fait le plus frappant du graphique est la variation de l'acidité libérée qui se fait nettement en deux temps, comme nous l'avons déjà fait remarquer précédemment (page 55) : très rapide au début, la pente s'infléchit assez rapidement entre la 1ère et la 2ème

heure, après laquelle l'acidité ne croît plus que lentement.

En première approximation, au cours de la 1ère heure, l'acidité apparue et les acides gras libérés sont à peu près du même ordre, bien qu'au début ceux-ci soient un peu inférieurs. Entre la 1ère et la 2ème heure il y a coïncidence, et par la suite le taux des acides gras reste constant, ce qui indique leur libération totale au bout de ce temps (1 h. - 1 h,30). Par contre l'acidité libérée continue à croître bien que beaucoup plus lentement. On ne peut évidemment pas attribuer cette augmentation aux acides gras, qui restent constants. Si d'autre part nous considérons la libération de la choline, nous constatons qu'elle n'a lieu que très lentement, contrairement à ce qui se passe pour les acides gras; lorsqu'au bout d'une heure ceux-ci sont pratiquement libérés, à peine 20 p. 100 de la choline (0,33 cm3/1,66 cm3), se trouvent détachés. La totalité n'apparait qu'au bout d'une cinquantaine d'heures. Or l'acidité qui est restée à peu près stable de la 2ème à la 16ème heure (pendant que la choline continue à être libérée régulièrement) augmente à partir de ce moment et continue à croître même au-delà de ce moment. Cette apparition n'est donc pas non plus attribuable à l'oxhydrile libéré par la saponification de la liaison cholinique qui semble se faire sans variation appréciable d'acidité.

D'ailleurs, pour pouvoir lui être attribuée, il faudrait de plus qu'au moment de la libération totale(vers la 50ème heure), l'acidité cessât d'augmenter et qu'à ce stade la valeur de cette acidité supplémentaire équivalût à la choline libérée soit :

9,2 cm3; or celle-ci n'est que de 6,2 cm3 (28,3 acidité totale - 22,1 acidité des acides gras).

2 - Variations comparées de l'acidité libérée (en plus de celle des acides gras) et du phosphore hydrosoluble à l'état d'acide glycérophosphorique libre

En portant son attention sur les variations de l'acidité libérée au-delà du moment où la totalité des acides gras est saponifiée, (entre la 1ère et la 2ème heure), qui ne peut s'expliquer par la libération de la choline, et en les comparant aux variations du phosphore hydrosoluble à l'état d'acide glycérophosphorique libre, on constate qu'il y a un certain parallélisme. On ne peut espérer une concordance réellement satisfaisante car, notre dosage de l'acide glycérophosphorique libre, en présence de GPG, est entaché certai-

nement d'une erreur systématique par excès et variable selon la proportion relative de GPG.

On peut admettre comme probable, que cette acidité supplémentaire est due à l'apparition de l'acide glycérophosphorique dissimulé primitivement sous forme de GPG.

3 - Variations comparées des diverses formes de phosphore

Comme nous l'avons fait remarquer précédemment, nous ne discuterons pas les résultats obtenus au-delà d'une dizaine de jours. En effet, depuis la 20ème heure jusqu'au 10ème jour environ, le phosphore total hydrosoluble dosé sous ses deux formes, glycérophosphorique et GPG, reste à peu près constant, même en y ajoutant les 5 p. 100 environ existant sous forme liposoluble il ne représente que 81 p. 100 du phosphore qu'on est en droit d'attendre d'après le dosage par destruction nitrico-magnésienne. Brusquement à partir de ce moment le phosphore hydrosoluble se met à augmenter pour atteindre à peu de chose près la valeur attendue.

Il s'agit très vraisemblablement d'impuretés phosphorés beaucoup plus résistantes.

Dans le tableau suivant nous donnons la répartition du phosphore sous ses diverses formes en fonction du temps.

Pour 100 de P total dosé par hydrolyse à chaque stade		1/4 h	20 h	15 j	30 j
Phosphore liposoluble (insaponifié et savons des acides gras)		11,58	5,73	5,16	4,11
Phosphore hydrosoluble	Glycérophosphate total	20,75	22,12	49,05	55,5
	Glycérophosphatogène total	67,67	72,15	45,8	40,4

D'autre part les proportions relatives des 2 formes hydrolosubles varient très sensiblement avec le temps comme le montre le graphique. La proportion de GPG maximum vers la 20ème heure (ordre de 76,5 p. 100) diminue lentement avec le temps montrant l'hydrolyse du GPG sous l'influence de l'alcalinité du milieu.

En résumé, l'hydrolyse de la lécithine d'oeuf sous l'action des alcalis a lieu par stades successifs, que l'on peut schématiser de la manière suivante :

A 34-35°, les acides gras apparaissent d'abord et d'une façon très rapide (50 p. 100 en 1/4 d'heure), tandis que la choline n'est libérée que bien plus lentement (50 p. 100 en 2 heures). Le composé phosphoré, formé par suite de l'élimination successive des acides gras et de la choline, n'est pas l'acide glycérophosphorique, mais est au moins pour sa plus grande part du glycérophosphatogène, qui dès sa formation s'hydrolyse lentement pour donner l'acide glycérophosphorique. Celui-ci reste indéfiniment stable.

CHAPITRE IV

TENTATIVE D'ISOLEMENT DU GLYCEROPHOSPHATOGENE

Nous nous sommes adressé à l'adsorption pour essayer d'obtenir le glycérophosphatogène sous une forme plus pure que celle obtenue au cours des traitements de la lécithine. Nous avons pensé qu'ainsi nous pourrions le débarrasser de l'excès d'azote qu'il renferme lors de son extraction en solution alcoolique.

Le choix d'un adsorbant n'était pas aisé aussi en avons-nous essayé un certain nombre avant d'obtenir des résultats satisfaisants avec la permutite. Nous avons fixé tout d'abord notre attention sur les adsorbants utilisés en chromatographie, et ainsi nous avons étudié le comportement d'une solution alcoolique renfermant du glycérophosphatogène, vis-à-vis du gel de silice, de l'actigel, de l'alumine et du kaolin. Ce n'est qu'en dernier ressort que nous avons essayé les échangeurs d'ions, encouragé par la publication américaine de Horowitz et Beadle [22] qui adsorbent la choline en vue de son dosage sur un échangeur d'ions. Nos essais ont porté sur la déminéralite, sur la permutite et, sur le zeocarb (+).

Nous n'avons pas eu de résultats véritablement encourageants jusqu'à l'utilisation de la permutite ordinaire.

Lors de nos essais d'adsorption par le gel de silice, nous sommes parti de solutions alcooliques contenant les résidus d'évaporation de lécithine hydrolysée par la potasse et dont les acides gras ont été extraits par le benzène. Cette solution contient donc encore la choline et le glycérophosphatogène. Nous avons opéré avec des solutions renfermant des quantités d'azote et de phosphore variables et par ailleurs nous avons fait varier la concentration du gel de silice par rapport au volume de la solution à adsorber. Le gel de silice a été lavé au préalable.

(+) Nous remercions vivement la firme Philipps & Pain, 31 rue de la Vanne, Montrouge, qui nous a fourni gracieusement les produits que nous lui avons demandés (déminéralite, zéocarb, permutite).

La solution alcoolique après passage sur l'adsorbant est évaporée à l'étuve à 37° et ramenée au volume initial par dissolution du résidu dans l'eau distillée. L'azote et le phosphore sont dosés avant et après adsorption.

Les résultats obtenus montrent qu'en utilisant 20 grammes de gel de silice pour 100 cm3 de solution à adsorber et avec des concentrations de 65 mg. d'azote pour 100 cm3, on ne réussit à adsorber qu'environ 30 p. 100 de l'azote.

Si au contraire on diminue et les proportions de silice (10 p. 100) et les concentrations en azote (12 mg pour 100) et en phosphore (76 mg pour 100) on obtient une fixation d'azote de 60 p. 100 à peu près sur la silice. Toutefois le phosphore est également adsorbé par la silice en grosse proportion environ 66 p. 100, si bien que le rapport azote-phosphore de la solution adsorbée reste à peu près le même que celui de la solution avant adsorption.

L'actigel granulé n'adsorbe pas du tout l'azote qui se trouve dans la solution.

Nous avons alors fait des essais avec l'alumine pour chromatographie. Nous avons pratiqué l'adsorption de solutions alcooliques renfermant de la choline et du glycérophosphatogène résultant d'hydrolyse de lécithine.

La solution est adsorbée par de l'alumine (20 ou 10 pour 100), l'alumine est alors desséchée à l'étuve à 37° et élutée avec de l'eau distillée (volume égal à celui de la solution primitive). Puis l'alumine subit encore trois nouvelles élutions par la soude normale. L'azote et le phosphore sont dosés dans chaque fraction du liquide adsorbé et de l'éluat. Nous avons remarqué ici encore qu'une trop forte concentration en azote et en phosphore nuit à l'adsorption. Les résultats dans les meilleures conditions de concentration montrent que l'azote reste adsorbé sur l'alumine dans la proportion de 50 à 60 pour 100 et le phosphore de 80 à 90 pour 100. La presque totalité de l'azote se retrouve dans l'éluat aqueux qui enlève en même temps la plus grande quantité de phosphore. Le premier éluat sodique entraîne le reste d'azote, un peu de phosphore, le deuxième éluat sodique n'enlève plus que quelques traces de phosphore.

Voici les chiffres trouvés au cours d'un essai exprimés pour

0,202 g. de lécithine mise à hydrolyser.

	N en µg		P en µg	
Avant adsorption	121		767	
Après adsorption	45		70	
Quantité adsorbée	76		697	
Eluat aqueux	60		291	
1er éluat sodique	14	74	87,4	439
2ème éluat sodique	0		43,7	
3ème éluat sodique	0		17,5	
Pertes	2		257,9	

Comme on le voit si les proportions d'azote et de phosphore adsorbées sont élevées, par contre l'élution à l'eau enlève également en très grande quantité et l'azote et le phosphore, les éluats sodiques n'enlevant même pas autant de phosphore que l'eau. Nous avons donc abandonné l'alumine.

Le kaolin n'a pas un gros pouvoir d'adsorption, il ne fixe que 16 pour 100 d'azote et 30 p. 100 de phosphore. L'eau élue la presque totalité de l'azote fixé et 50 pour 100 du phosphore, ce qui présente peu d'avantages d'autant plus que la soude normale entraine seulement des traces indosables de phosphore.

Le premier échangeur d'ions que nous avons utilisé est la déminéralite (+). Elle est un corps résultant de la préparation de

(+) Ces renseignements nous ont été fournis par la firme Philipps & Pain.

produits de condensation et d'oxydation d'amines ou de mélanges d'amines obtenus par exemple en partant de l'aniline, des phénylènodiamines ou de leurs homologues. Mais nous n'avons pas obtenu de résultats satisfaisants. La déminéralite se présente sous la forme de grains noirs, elle communique au liquide très souvent une certaine coloration, donne des solutions visqueuses sous l'action de la soude normale. Cette difficulté d'emploi nous l'a fait rejeter.

Le Zéocarb (+) est également un échangeur d'ions dont le nom même indique ses fonctions zéolithiques et son constituant essentiel : le carbone. Il est préparé en partant de charbons, lignites, etc..., qui sont traités par certains acides: acide sulfurique, acide chlorhydrique, avant d'être stabilisés. La matière finale est constituée par des corps hydrocarbonés dont les molécules complexes appartiennent au groupe des matières humiques. Nous n'avons pu utiliser le Zéocarb car il nous donnait des excès d'azote.

(+) Ces renseignements nous ont été fournis par la firme Philipps & Pain.

TENTATIVE D'ADSORPTION DU GPC PAR LA DEMINERALITE (PERMUTITE)

Devant les échecs que nous avons rencontrés avec les adsorbants précédents nous avons essayé la permutite simple (utilisée de façon courante pour la déminéralisation des eaux). La permutite se présente sous forme de petits grains blancs translucides.

L'appareillage nécessaire est très simple : la colonne d'adsorption est faite d'une canne de verre de 11 mm de diamètre et de 400 mm de longueur, qui est effilée à sa partie inférieure. Un petit tampon de coton hydrophile est introduit jusqu'au début de la partie effilée, ensuite on remplit de permutite la colonne jusqu'à 5 cm environ du bord supérieur (il faut environ 40 grammes de permutite).

Horowitz et Beadle [23] ont utilisé la faculté d'adsorption de la choline sur un échangeur d'ions (le I.R. 100) pour isoler de très faibles quantités de choline d'un milieu complexe, afin de la doser (élution par une solution de chlorure de sodium à 5 p. 100) microbiologiquement avec une souche de Neurospora.

Nous avons réglé une fois pour toutes la vitesse d'écoulement des solutions adsorbées à raison d'une goutte toutes les 4 secondes. Cette vitesse permet un contact suffisamment prolongé du liquide à étudier avec la permutite.

Si nous faisons passer de l'eau distillée dans les conditions fixées sur la colonne de permutite, nous constatons que l'eau recueillie donne normalement avec le réactif de Misson une certaine coloration. Cette particularité introduit une cause d'erreur dans nos dosages. Nous en avons tenu compte.

Nous avons vérifié que le chlorhydrate de choline est bien adsorbé intégralement par la permutite. Cette adsorption se fait aussi bien en milieu aqueux qu'alcoolique. En milieu aqueux l'élution de la Choline fixée est obtenue à l'aide de solutions salines , telles que la solution de chlorure de sodium à 10 p. 100. Cette propriété nous interdisait d'employer pour fixer la choline une solution aqueuse du résidu d'hydrolyse de la lécithine après extraction des acides gras, car cette solution est riche en sulfate de potassium qui empêche cette fixation. Nous avons donc été amené à nous placer en milieu alcoolique absolu, l'extraction de notre résidu par ce solvant laissant insoluble le sel.

Nous avons donc fait passer la solution alcoolique du résidu débarrassé des acides gras provenant de l'hydrolyse alcaline de la lécithine sur une colonne de permutite, la choline est fixée complètement, mais nous avons constaté que le GPC subit également une adsorption presque totale.

Cette observation nous a ainsi fourni le moyen cherché depuis longtemps, de "sortir" du milieu où il a pris naissance, le GPC issu de l'hydrolyse de la lécithine; nos recherches dans ce but, basées sur la découverte d'un sel insoluble, ayant toutes échoué.

La colonne de permutite, ayant fixé ainsi en milieu alcoolique la choline et le GPC , fut alors éluée par l'eau distillée. On pouvait espérer détacher le GPC sans toucher à la choline.

C'est bien ce qui se passe en effet, si on met en oeuvre une quantité relativement faible de GPC.

A travers une colonne de permutite on fait passer 10 cm3 de solution issue de notre hydrolyse alcaline et renfermant en tout 4,48 mg de Phosphore et 25,3 mg de choline. On déplace la solution qui imprègne l'adsorbant par de l'alcool absolu de façon à obtenir 10 cm3 de liquide. La choline a disparu et le phosphore ne représente plus que 8 p. 100 du phosphore primitif. Ce phosphore non fixé ne paraît contenir que de faibles quantités de GPC (la différence entre les quantités de phosphore dosées par les techniques de la simple et la "double hydrolyse" est très faible). Il serait donc surtout sous forme glycérophosphorique.

En traitant ensuite la permutite par de l'eau distillée, on constate que la choline reste fixée tandis que le phosphore est pratiquement élué en totalité.

Voici les résultats :

Volume recueilli	P dans ce volume en mg
25 cm3	3,44
10 cm3	0,46
10 cm3	0,26
10 cm3	0,16
10 cm3	-
Total : 63 cm3	4,32 Théorie : 4,48

Mais si, avec la même colonne et de la permutite fraîche, on utilise 50 cm3 (au lieu de 10 cm3) de solution alcoolique contenant du phosphore et de la choline, en concentration double, soit 8,96 mg/cm3 de phosphore, ce qui pour les 50 cm3 représente 44,8 mg, on constate que la fixation est aussi bonne, mais que lorsqu'on traite par l'eau, le liquide aqueux contient de la choline, l'élution par l'eau du GPG donnant probablement une solution saline suffisamment concentrée pour éluer la choline.

Voici nos résultats :

Lavage	Volume recueilli	Choline	P dans ce volume
•	25 cm3	présence	39,30 mg
•	10 cm3	"	8,44 mg
•	10 cm3	"	1,66 mg
•	10 cm3	"	0,35 mg
	10 cm3	"	0
Total :	65 cm3		49,75 Théorie : 44,8

L'excès de phosphore trouvé provient du fait que la permutite, comme nous l'avons signalé, cède à l'eau une petite quantité de substances se colorant par le réactif de Misson.

Pour éliminer la choline ainsi éluée, nous avons alors fait passer le liquide aqueux précédent sur une nouvelle colonne de permutite fraîche. Au début de l'expérience, la choline reste fixée (on recueille ainsi un filtrat exempt de choline et contenant 35,7 p. 100 du phosphore total mis en oeuvre, mais par la suite on voit apparaître la choline).

Dès qu'on a recueilli la totalité du phosphore, les liquides de lavage, souillés de choline (65 cm3), sont réunis et on les fait passer sur une 3ème colonne de permutite. Le liquide recueilli ainsi que les eaux de lavage sont alors exempts de choline.

Nous sommes ainsi arrivé à récupérer la plus grande partie du phosphore mis en oeuvre et à le séparer complètement de la choline. Toutes les solutions aqueuses contenant du phosphore et exemptes de choline sont évaporées à sec à basse température et épuisées par l'alcool absolu bouillant.

On obtient ainsi, en partant des 50 cm3 (contenant 44,8 mg de P) un résidu pesant 321 mg (après dessiccation dans le vide à 78°).

L'analyse de ce produit nous a donné les résultats suivants :

	p. 100	Pour la totalité (321 mg)
Phosphore total	10,2	32,8 mg
Azote total	0,45	1,47 mg
P glycérophosphorique :		
a) avant traitement par ClH N à 100°	0,13	3,8 mg
b), après traitement par ClH N à 100°	10,2	32,8 mg

On voit d'après ces chiffres que l'azote a été pratiquement éliminé (il correspond à 4,5 p. 100 de phosphore); et que le phosphore sous forme d'acide glycérophosphorique non dissimulé ne dépasse pas la proportion de 11,58 p. 100 de phosphore total. Elle est certainement inférieure à ce taux, car il est très probable qu'au cours de l'hydrolyse de l'acide glycérophosphorique à pH 4,1 une certaine quantité (petite mais non négligeable) de GPG, est transformée en acide glycérophosphorique qui subit lui-même l'hydrolyse en glycérol et acide phosphorique.

A propos de la purification du glycérophosphatogène

Une des difficultés qui nous a retenu le plus longtemps, jusqu'au moment où nous avons pu, d'une part déterminer d'une façon précise le temps nécessaire pour la libération de la choline sans hydrolyser le GPG, et d'autre part séparer grâce à la permutite le GPG du milieu générateur, fut la présence constante d'azote dans nos produits soumis aux moyens de purification dont nous disposions alors.

Nous avons été amené ainsi à nous préoccuper de la nature de l'impureté azotée qui accompagnait le GPG. Il était naturel de penser à la présence possible de colamine (et éventuellement même de sérine) persistant après l'élimination de la choline.

C'est dans ce but que nous avons mis au point un dosage de la colamine en présence de choline au moyen de l'acide periodique, méthode qui a été décrite au chapitre I page 29.

Il se trouve d'ailleurs que la sérine [24] est attaquée dans des conditions analogues, et que tout au moins en premi ère approximation notre technique s'applique également à ce composé en présence de choline.

D'autre part, une série d'essais préliminaires nous a montré que ces substances azotées étaient en réalité liées au GPG, ce qui nous a expliqué pourquoi il nous était impossible de les éliminer sans entraîner en même temps le GPG.

Nous utilisons une préparation dont la composition est la suivante phosphore : 12,4 p. 100; azote : 0,678 p. 100 (solution A).

A) Hydrolyse du GPG et séparation du phosphore

Pour libérer les substances azotées nous hydrolysons la solution. Ce résultat est obtenu en ajoutant à la solution alcoolique une solution méthylique de baryte contenant une certaine quantité d'acétate de baryum.

Solution A	13 cm3
Solution méthylique d'hydroxyde de Ba N	5 cm3
Acide acétique cristallisable	0,15 cm3
Alcool méthylique	10 cm3

Après 24 heures de contact, au cours desquelles un précipité blanc s'est formé lentement, on termine l'hydrolyse par un chauffage de 1/4 d'heure au bain-marie bouillant. Après refroidissement, le précipité est séparé par centrifugation et lavé avec un peu d'alcool méthylique. L'analyse de ce précipité montre qu'il est constitué intégralement par du glycérophosphate de baryum. Le liquide séparé ne contient plus de phosphore, mais renferme tout l'azote de la solution primitive.

B) Etude de la solution après hydrolyse de GPG et séparation du phosphore

Le liquide alcoolique précédent est traité par la quantité d'acide sulfurique exactement suffisante pour séparer le baryum, le précipité de sulfate de baryum est séparé, la solution alcoolique est évaporée à sec et reprise par 12 cm3 d'eau, on obtient ainsi la solution B qui en tenant compte des pertes, correspond à peu près à 12 cm3 de la solution A.

a) Action de l'acide periodique

A 2,5 cm3 de solution B nous ajoutons 2 cm3 de solution d'acide periodique M/20. Si le milieu contient de la sérine ou de la colamine, l'oxydation de ces corps par l'acide periodique doit avoir produit de l'ammoniac. Le dosage à l'appareil de Pregl montre qu'il n'y a aucune formation de cette base. On peut en conclure que le milieu ne contient ni sérine ni colamine.

b) Dosage de la choline

Par contre l'addition de sel de Reinecke à la solution B, donne immédiatement un précipité moiré caractéristique.

Par contre la solution A dans des conditions de concentration comparables ne donne lieu à aucun précipité, et nous nous sommes assurés que cette même dernière solution additionnée d'une petite quantité de choline précipitait dans ces conditions. On peut donc affirmer que la choline n'apparaît qu'après hydrolyse.

Un dosage sur la solution B nous a montré que la choline trouvée correspond à peu près à celle que l'on pouvait calculer d'après l'azote total.

CONCLUSION

La substance azotée de notre solution A est constituée entièrement par de la choline liée, à l'exclusion de la colamine et de la sérine.

CHAPITRE V

QUELQUES PROPRIETES DU GLYCEROPHOSPHATOGENE

Nous ne saurions donner ici les propriétés exactes de ce que nous avons appelé avec Mr. P. Fleury le "glycérophosphatogène" (par hydrolyse il engendre du glycérophosphate), puisque nous n'avons pu isoler ce corps à l'état pur. Toutefois l'ensemble des réactions qui lui sont propres nous font admettre qu'il est l'élément phosphorique de base des lécithines d'oeuf. Nous allons simplement rappeler ici les propriétés de ce corps non isolé à l' état pur, que nous avons décelées au cours de notre étude de l'hydrolyse de la lécithine.

Solubilité

A l'état de sel alcalin aussi bien d'ailleurs que d'acide libre il est extrêmement soluble dans l'eau et également dans l'alcool absolu. Ce dernier caractère le différencie nettement des glycérophosphates alcalins qui sont insolubles dans l'alcool absolu même bouillant. Par contre, il est insoluble, même à l'état d'acide libre, dans l'acétone, l'oxyde d'éthyle, le benzène.

Propriétés chimiques

1) Le rapport base/phosphore dans le sel neutre

Si l'on détermine pour une préparation dont la réaction est au voisinage de pH 6,0 la quantité de base par rapport à un atome de phosphore, on trouve des valeurs qui, exprimées en atomes, sont voisines de 1. C'est ainsi qu'une préparation contenant 12,4 de phosphore p. 100 nous a donné un rapport base/phosphore de 1,05. Or les solutions de ces préparations neutres à la phtaléine sont pratiquement neutres aussi à l'hélianthine; autrement dit il suffit d'une quantité relativement faible d'un acide fort pour amener le virage de l'hélianthine du jaune à l'orange. La base est donc salifiée par un acide fort.

2) Hydrolyse en milieu acide et alcalin

Ces solutions neutres donnent naissance par hydrolyse convenable à un -OH d'acide faible pour une molécule d'acide phosphorique.

En effet si on les soumet à l'ébullition en milieu normal acide ou alcalin, on constate que, après saturation exacte du réactif introduit, le milieu redevient, comme primitivement, neutre à l'hélianthine mais est devenu acide à la phtaléine. La quantité d'alcali nécessaire pour neutraliser la solution à la phtaléine correspond sensiblement à la neutralisation de un -OH d'acide faible pour un atome de phosphore.

La solution qui, en milieu alcoolique à 50° avant hydrolyse ne donne qu'un léger précipité avec le chlorure de calcium, précipite abondamment après hydrolyse. Cette propriété constitue une réaction qualitative mais peu sensible du GPG.

Exemple

On opère avec 1 cm3 de solution contenant 51,5 mg d'une préparation à 11,35 p. 100 de phosphore.

Hydrolyse en milieu N au bain-marie bouillant :

H Cl		Na OH	
(Durée (en min.	NaOH N/10) (phtaléine)	(Durée en min.	NaOH N/10) (phtaléine)
7	1,41	10	1,52
10	1,54	20	1,60
20	1,75	60	1,74

Les quantités calculées, à partir du phosphore contenu dans la prise d'essai (51,5 mg) correspond à 1,80 cm3 N/10.

Cette acidolabilité et cette alcalinolabilité sont deux propriétés qui opposent le GPG à l'acide glycérophosphorique dont on connaît la stabilité complète en milieu alcalin et la résistance considérable à l'hydrolyse en milieu acide.

3) Stabilité à pH 4,1 environ

Comme l'acide glycérophosphorique présente un minimum de stabilité vers pH 4,1 (M.C. Bailly [25], nous avons comparé pour ce même

pH, la stabilité de ce composé avec celle du GPG. Ce dernier se montre beaucoup plus stable que l'acide glycérophosphorique. Tandis qu'une solution de ce dernier présentant ce pH 4,1 soumise 24 heures à 120° est complètement hydrolysée, les solutions de GPG à ce même pH ne le sont que très peu. Autant que nous puissions en juger par nos préparations impures, l'hydrolyse dans ces conditions ne dépasse pas 10 p. 100.

Nous avons donné plus haut des exemples démonstratifs de cette propriété qui s'est montrée précieuse pour doser d'une façon approximative mais sûre le GPG en présence d'acide glycérophosphorique.

CONCLUSION

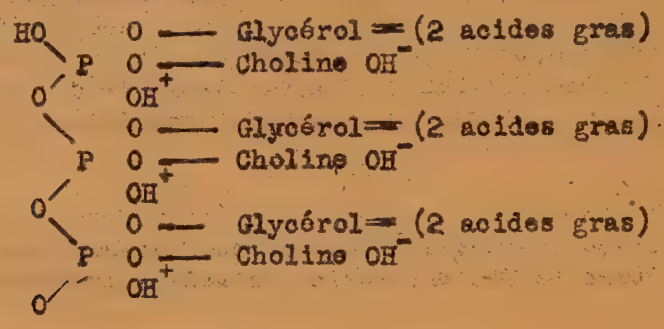
Les préparations impures isolées après hydrolyse de la lécithine renfermeraient pour leur plus grande part un composé phosphoré, le glycérophosphatogène, non azoté, soluble dans l'alcool absolu, stable à pH 4,1, hydrolysable en milieu alcalin et en milieu acide, en donnant d'une façon pratiquement exclusive de l'acide glycérophosphorique résultant de l'apparition pour un phosphore d'un -OH ayant les propriétés d'un acide faible.

Comme d'autre part le GPG ne semble présenter qu'un -OH salifiable et ayant les propriétés d'un acide fort, on est obligé d'admettre que le GPG est constitué par des molécules d'acide glycérophosphorique enchaînées les unes aux autres par leur -OH à réaction d'acide faible. La manière la plus simple de concevoir cet enchaînement est d'admettre la formation de liaisons entre les -OH de deux molécules d'acide phosphorique comme dans le cas de l'acide phosphorique.

P. Fleury a tenté de synthétiser l'acide glycéropyrophosphorique et n'a pu encore isoler ce composé, mais il a obtenu des solutions qui paraissent en contenir. Or ces solutions livrent l'acide glycérophosphorique par hydrolyse, comme le GPG , mais les conditions de stabilité de ce générateur d'acide glycérophosphorique paraissent tout à fait différentes de celles présentées par le GPG, qui ainsi ne pourrait être identifié à l'acide glycéropyrophosphorique.

Si d'autre part on écarte l'hypothèse d'une liaison ester entre un -OH de l'acide glycérophosphorique et une fonction alcool du glycérol appartenant à une autre molécule glycérophosphorique (liaison résultant d'un artefact par une sorte d'alcoolyse, au moment même de la libération de l'acide gras lié à cette fonction alcool) il faut

admettre un enchaînement polyphosphorique du type ci-dessous :



Il est à remarquer que, dans cette formule, l'acide phosphorique apparait sous la forme dite "pentaphosphorique", dont on connait des exemples aussi bien en chimie minérale qu'en chimie organique.

Si cette hypothèse pouvait être confirmée, elle modifierait assez profondément notre conception de la structure de la lécithine qui apparaîtrait ainsi sous forme d'une grosse molécule, au sens actuel mot.

Dans cette conception, il n'est pas impossible que le GPC se présente sous forme d'un mélange de chaînes plus ou moins longues et qu'on ne puisse ainsi "stricto sensu", parler d'un composé définitif.

Mais il va de soi que la vérification de cette formule reste liée à l'isolement de ce composé à l'état pur. Or jusqu'ici les meilleures préparations bien que pratiquement non azotées, ne contiennent que 80 p. 100 environ du phosphore attendu.

CHAPITRE VI

ESSAI D'HYDROLYSE D'ECHANTILLONS DE LECITHINE PURIFIEE PREPAREE A PARTIR DE LA LECITHINE CADMIQUE

Avant d'exposer les résultats que nous avons obtenus lors d'hydrolyses de lécithine purifiée, nous allons donner le mode de préparation de cette lécithine à partir de la lécithine cadmique.

A) Préparation de la lécithine purifiée, à partir de la combinaison cadmique.-

Levene et Rolf [26] ont proposé de récupérer la lécithine à partir de la lécithine cadmique en faisant agir une solution méthylique d'ammoniac sur une solution chloroformique de lécithine cadmique. L'hydroxyde de cadmium formé est séparé par centrifugation et la solution chloroforme-méthylique est évaporée sous pression réduite. La lécithine qu'ils obtiennent ainsi est d'après eux-mêmes trop riche en azote. Ils réalisent une purification plus poussée en traitant une solution éthérée de cette lécithine déjà purifiée, par l'acide acétique. La lécithine est précipitée du milieu par l'acétone.

Par cette méthode nous n'avons jamais pu nous débarrasser de l'azote ammoniacal introduit pour la précipitation du cadmium. Aussi avons-nous mis au point une autre technique.

PRINCIPE

Le cadmium d'une solution alcoolique de lécithine cadmique est précipitée sous forme d'hydroxyde par la diéthylamine pure, la solution alcoolique de lécithine contenant encore un excès d'azote provenant de la diéthylamine est évaporée à sec et le résidu est repris par le benzène qui ne dissout que la lécithine à l'exclusion du chlorhydrate de diethylamine. Pour éliminer les dernières traces de ce sel, le résidu sec provenant de la solution benzénique est repris par l'alcool et versé dans l'eau de manière à donner une émulsion qu'on agite avec du dichloréthane; l'émulsion se résout par repos et la couche inférieure brune de dichloréthane contient la lécithine pure alors que la couche supérieure hydro-alcoolique contient du chlorhydrate de diéthylamine, insoluble dans le dichloréthane.

TECHNIQUE

1°) Précipitation de l'hydroxyde de cadmium par la diéthylamine

L'élimination du cadmium à l'état d'hydroxyde par action de la diéthylamine sur une solution alcoolique de lécithine cadmique purifiée se fait exactement comme pour le dosage du cadmium dans ce produit (voir chapitre I page 22).

A ce stade nous avons après centrifugation :

- un culot d'hydroxyde de cadmium
- une solution alcoolique de lécithine.

Comme nous l'avons vu, le précipité d'hydroxyde de cadmium a entraîné une quantité non négligeable de lécithine (avec une solution contenant 0,905 g. de lécithine cadmique on trouve dans les 3 alcools de lavage du précipité d'hydroxyde de cadmium 67 mg. de lécithine et dans l'éther de lavage 28,5 mg., soit en tout 95,5 mg. de lécithine).

2°) Elimination de l'excès de diéthylamine à l'état de chlorhydrate par traitement au benzène.-

Le liquide surnageant renferme de la diéthylamine en excès et du chlorhydrate de diéthylamine. Il faut dès la centrifugation neutraliser cette solution pour éviter tout début d'hydrolyse de la lécithine. Pour ce faire nous amenons la solution à un volume connu, 100 cm3 par exemple avec du méthanol absolu, si nous sommes parti de 1 g. de lécithine cadmique. Une prise d'essai de 2 cm3, après addition de II gouttes de phénolphtaléine (la coloration rose n'apparaît qu'après addition d'eau) est titrée par ClH N à la microburette. Nous ajoutons alors aux 98 cm3 restants la quantité calculée de ClH N.

Avant de trouver un solvant de la lécithine qui ne dissolve pas le chlorhydrate de diéthylamine, nous devons éliminer l'alcool. Nous avons essayé de réaliser cette élimination en versant la solution dans un cristallisoir sous une cloche à vide, mais la production d'une mousse abondante nous a contraint à opérer l'évaporation en vase clos. Nous obtenons une évaporation excellente, rapide (environ 2 heures pour un peu plus de 100 cm3 de la solution, vide pratiqué avec une trompe à eau), sans production de mousse, donnant un produit à peine coloré en jaune, en opérant dans un ballon à distiller dans le vide, que nous plaçons sur un bain-marie dont la température ne dépasse pas 60° (une température plus élevée risquerait d'altérer la lécithine).

Le résidu gras à peine jaune contenu dans le ballon. renferme de la lécithine et du chlorhydrate de diéthylamine, qu'il faut séparer, nous avons essayé de réaliser cette séparation par des differences de

solubilité. L'éther de pétrole nous paraît à rejeter tout de suite car il ne dissout pas bien la lécithine. Par contre le benzène se montre un excellent solvant de la lécithine, il laisse insoluble le chlorhydrate de diéthylamine (nous avons vérifié que cette insolubilité est totale). Pour que la dissolution du résidu du ballon se fasse bien dans le benzène, il faut que ce résidu soit parfaitement sec et ne renferme plus une trace de la solution alcoolique, aussi est-il préférable de le mettre dans un dessiccateur à anhydride phosphorique sous vide pendant 12 à 24 heures. Il faut en moyenne 25 cm3 de benzène pour 1 g. de lécithine cadmique traitée. Si le ballon n'a pas été séché rigoureusement, il se produit une suspension de type colloïdal dans le benzène, que l'on ne peut résoudre par la suite. Nous recueillons dans un tube à centrifuger la solution benzénique de lécithine tenant en suspension le chlorhydrate de diéthylamine. Après centrifugation, nous avons dans le tube un culot blanc surmonté du benzène coloré en jaune. Pour extraire la lécithine qui risque d'être emprisonnée dans le culot de chlorhydrate de diéthylamine, nous faisons trois lavages au benzène par centrifugation en remettant en suspension le culot à chaque lavage, le liquide a alors un aspect azuré et moiré. Au dernier lavavage le benzène surnageant est parfaitement incolore. Les solutions benzéniques sont réunies et mises à distiller dans le vide. Cette distillation se fait sans difficulté. Quand la totalité du benzène est évaporée, on place le ballon dans un dessiccateur à anhydride phosphorique sous le vide pendant 12 à 24 heures. Le résidu est alors repris par le méthanol ou l'éthanol absolus, la dissolution est complète au bain-marie.

Bilan d'une opération :

Lécithine cadmique traitée	782,3 mg.
(correspondant en lécithine à	633,6 mg
Lécithine entraînée dans $Cd(OH)^2$	42,6 mg
Lécithine trouvée en fin d'opération	475 mg.
au lieu de 633,6 - 42,6 théoriquement	591 mg.

3°) <u>Examen de la préparation : elle contient encore de la diéthylamine.</u>

Nous pouvions craindre qu'il restât un peu d'azote provenant de la diéthylamine dans la solution alcoolique finale de lécithine. aussi avons-nous dosé l'azote et le phosphore dans cette solution.

Nous partons d'une solution alcoolique de lécithine obtenue comme précédemment, dont on calcule le titre en faisant un extrait sec dans le vide à 56° dans une nacelle de quartz tarée. Titre : 1 cm3 = 31,5 mg. de lécithine. Sur cette solution nous faisons un dosage d'azote et un dosage de phosphore selon les techniques usuelles.

Nous obtenons :

2,45 p.100 de phosphore (3,86 p.100 de phosphore théorique)
5,66 p.100 d'azote (1,74 p.100 d'azote théorique)

Ces dosages montrent que l'enrichissement en azote et l'appauvrissement en phosphore de la solution de lécithine sont dûs (puisque ces dosages sont ramenés au poids de l'extrait sec) à la présence d'un corps azoté, non phosphoré autre que la lécithine (sans doute le chlorhydrate de diéthylamine proportionnellement beaucoup plus riche en azote que la lécithine).

4°) Elimination des dernières traces d'impureté par transformation en émulsion et épuisement par le chlorure d'éthylène.-

Robert H. Sifferd [27] donne un procédé pour extraire la lécithine de solutions ou d'émulsions aqueuses par le dichlorure d'éthylène. En partant de cette idée nous avons pensé pouvoir éliminer le chlorhydrate de diéthylamine restant dans notre solution alcoolique de lécithine purifiée.

Avant d'opérer sur la solution en question nous avons voulu contrôler la technique de Sifferd. Nous prenons 10 cm3 d'une solution alcoolique de lécithine à 15 p. 100, que nous transformons en émulsion en y versant goutte à goutte et en agitant 25 cm3 d'eau. L'agitation dans une ampoule à décantation avec 15 cm3 de dichloréthane ne modifie pas l'aspect de l'émulsion. Nous cherchons à rompre l'émulsion par addition de 10 g. de chlorure de sodium mais sans succès.

Nous décidons alors de faire notre émulsion de lécithine en sens inverse. Dans 10 cm3 d'eau nous versons goutte à goutte en agitant 5 cm3 d'une solution de lécithine (contenant 0,635 g. de lécithine); nous obtenons une émulsion plus dense que précédemment. Après agitation à diverses reprises dans une ampoule à décantation avec 15 cm3 de dichloréthane nous obtenons après repos d'une nuit :

- une solution brune limpide à la partie inférieure (lécithine dans le dichloréthane = 0,625 g)

- une émulsion blanchâtre à la partie supérieure, émulsion qui se résout avec le temps pour donner une solution jaune.

Une deuxième extraction au dichloréthane ne donne rien de plus, le rendement est ici de 98,4 p.100.

Le résidu d'évaporation de la solution dans le dichloréthane est repris par 10 cm3 d'alcool, dans lequel il n'est pas soluble

totalement. La partie insoluble est séparée par centrifugation, les 10 cm3 d'alcool renferment alors 0,503 g. de lécithine. Nous y dosons l'azote et le phosphore :

P 1 cm3 de la solution = 3,996 mg. de P; titre 3,9 p.100
N 1 cm3 de la solution = 1,08 mg. de N; titre 2,00 p.100

chiffres qui sont très proches des chiffres théoriques.

De plus nous avons vérifié l'insolubilité du chlorhydrate de diéthylamine dans le dichloréthane.

Nous appliquons alors cette technique de purification à notre résidu provenant de l'évaporation du benzène. Ce résidu est repris par l'alcool de manière à obtenir une solution alcoolique de lécithine dont le titre est voisin de 10 p.100. Cette solution est versée goutte à goutte dans le double de son volume d'eau distillée. L'émulsion obtenue est versée dans une ampoule à décantation, que l'on agite vigoureusement 5 minutes après addition d'un volume de dichloréthane égal à celui de la solution alcoolique de lécithine mise en oeuvre. On laisse reposer en agitant plusieurs fois au cours de la journée. La couche inférieure de lécithine dans le dichloréthane est séparée puis mise à évaporer dans le vide. Le résidu de lécithine est pesé.

B) Etude de l'hydrolyse sur des échantillons de lécithine purifiée en passant par la lécithine cadmique.

Dans le but de nous rendre compte s'il était possible de vérifier sur des lécithines d'oeuf convenablement purifiées nos principales observations concernant le GPC.

Nos expériences ont porté sur deux échantillons L_1 et L_2 (dont la provenance est indiquée au § B du chapitre II page 44), obtenus à partir d'une solution éthylique de lécithine d'oeuf Armour titrant 8,2 p.100 et dont la composition pour des raisons que nous ignorons fut beaucoup moins satisfaisante que celles d'échantillons dans nos expériences de mise au point.

1°) Lécithine L_1.-

La lécithine purifiée à partir de la lécithine cadmique L_1 est mise en solution dans le méthanol absolu à chaud, on détermine alors sa composition :

Phosphore total	4,13 p.100
Azote total	1.96 p.100

Choline	13,18 p. 100
Acides gras	21,0 cm3 de solution N p.100

On établit ensuite les rapports en atomes ou molécules :

Azote / phosphore = 1,00; choline / phosphore = 0,84
Acides gras/phosphore = 1,58; choline / acides gras = 0,53

Nous consignons ci-dessous les résultats obtenus avec cette lécithine L1, relatifs au GPC; ces résultats sont exprimés en mg de phosphore pour 1 g de lécithine, en fonction du temps d'hydrolyse :

Durée de l'hydrolyse	Température	P hydrolysé à pH 4,1	
		avant ClH N à 100°	après ClH N à 100°
64 h.	36°	11,60	31,87
15 jours	36°	11,98	32,35

Toute la choline est libérée après 64 heures d'hydrolyse à 36°.

2°) Lécithine L_2. -

Une solution méthylique de lécithine obtenue à partir de la lécithine cadmique L_2 de la même manière nous donne :

Phosphore total	4,30 p. 100
Azote total	1,77 p. 100
Choline	10,07 p. 100
Acides gras	20,90 cm3 de solution N p. 100

Les rapports sont :

azote/phosphore = 0,91; choline/phosphore = 0,61
acides gras/phosphore = 1,51; choline/acides gras = 0,41

Toute la choline est libérée au bout de 64 heures d'hydrolyse à 36°.

Etude du phosphore

Durée de l'hydrolyse	Température	P hydrolysé à pH 4,1		P nitrico-magnésien
		avant ClH N à 100°	après ClH N à 100°	
64 h.	36°	8,18	36,26	38,13
6 h.	100°	37,10	38,85	40,48

Conclusions:

1°) La lécithine issue de la combinaison cadmique se conduit comme la lécithine primitive au point de vue de la formation du GPG.

2°) Le GPG en milieu alcalin à 36° ne diminue que lentement avec le temps. Il ne disparait pratiquement qu'après chauffage à 100° pendant 6 heures.

3°) Nous retrouvons dans ces produits cette forme de phosphore particulièrement résistante déjà signalée plus haut, le maximum de l'acide phosphorique obtenu par une hydrolyse de 15 jours à 36° est inférieur à celui obtenu après 6 heures à 100° et ce dernier n'atteint pas tout à fait celui qu'on peut obtenir par destruction nitrico-magnésienne.

RESUME & CONCLUSIONS

1° - Les techniques

a) L'étude systématique de la marche de l'hydrolyse alcaline de la lécithine d'oeuf en milieu méthylique a nécessité l'emploi d'une série de techniques permettant de suivre la libération des divers constituants. La plupart de ces techniques sont classiques. Cependant nous avons mis au point le dosage colorimétrique de la choline à l'état de Reinéckate. D'autre part l'éventualité d'un dosage de la colamine en présence de choline nous a amené à donner à ce problème une solution originale au moyen de l'acide periodique en montrant que ce réactif oxyde régulièrement la monoéthanolamine et respecte intégralement la choline.

b) Amené à nous préoccuper de la préparation d'une lécithine pure, nous avons mis au point la préparation de la lécithine cadmique et la régénération de la lécithine pure à partir de son composé cadmique. Le problème du dosage du cadmium ainsi posé à ce propos a fait l'objet de recherches qui ont abouti à un procédé de dosage du sulfure par iodométrie.

2° - Résultats de l'étude de l'hydrolyse

Nous avons montré que l'hydrolyse s'effectuait par stades successifs : la libération des acides gras est extrêmement rapide (à 37° en milieu alcalin N il faut 1/4 d'heure pour en libérer 50 p.100). La choline n'est libérée que bien plus lentement (en milieu alcalin N à 37° il faut 2 heures pour en libérer 50 p. 100).

Enfin même après libération des acides gras et de la choline, le phosphore est très loin d'être complètement sous forme d'acide glycérophosphorique, il faut attendre plusieurs semaines pour atteindre ce résultat. Ce phénomène se retrouve si l'on opère sur la lécithine régénérée à partir de la lécithine cadmique. Ce précurseur de l'acide glycérophosphorique a été appelé par P. Fleury "glycérophosphatogène"(GPG). Nous avons confirmé et parfois précisé les faits établis antérieurement par P. Fleury.

3° - Quelques propriétés du glycérophosphatogène

Le GPG n'a pu être isolé à l'état pur. Cependant nous avons pu l'obtenir pratiquement exempt d'azote.

Il est soluble dans l'alcool éthylique absolu, ce qui permet de le séparer des glycérophosphates alcalins.

En solution dans l'éthanol il est fixé par passage sur une colonne de permutite, mais non en solution aqueuse. Par contre la choline dans les mêmes conditions est fixée aussi bien en milieu aqueux qu'alcoolique. Cette différence permet la séparation du GPG d'avec la choline.

Le GPG peut être complètement hydrolysé au bain-marie bouillant en acide glycérophosphorique aussi bien en milieu acide normal qu'en milieu alcalin normal, avec libération d'un -OH acide faible pour un P.

Par contre il résiste longuement à l'hydrolyse à pH 4,1 dans des conditions où l'acide glycérophosphorique est hydrolysé. Cette résistance permet le dosage de ce dernier composé en présence de GPG.

L'ensemble de ces faits apporte un appui expérimental aux premières conclusions des recherches de P. Fleury tendant à admettre que dans la lécithine d'oeuf le phosphore existe sous forme non pas d'acide glycérophosphorique, mais d'un dérivé polyglycérophosphorique (glycérophosphatogène).

Vu

Le Président de la thèse :

P. Fleury

Vu 22 Décembre 1948

Le Doyen de la Faculté de Pharmacie

R. Fabre

Vu et permis d'imprimer

Le Recteur de l'Académie de Paris

BIBLIOGRAPHIE

BAILLY M.C. Recherches sur la transposition et l'hydrolyse des monoesters orthophosphoriques du glycérol. Thèse Doct. Sc. Phys. Paris, 1941 4, 25

BOISSON R. Action de l'acide periodique sur l'acide lactique et l'acide pyruvique. Thèse Doct. Univ. Pharm. Paris, 1939 18

BOIVIN A. Microdosage de l'azote par destruction sulfurique. Bull. Soc. Chim. Biol. 1929, 10, 1344 6

FLEURY P. Sur l'hydrolyse de la lécithine d'oeuf et sur la constitution de ce phosphatide. C.R. Acad. Sc. 1948, 226, 441. 2

FLEURY P. Fiches de Chimie Biologique : Microdosage de l'ammoniac par micro-Schloesing, Urine 4ter 7

FLEURY P. & Coll. Voir à ce sujet un exposé d'ensemble dans le travail de Mme Fiévet-Guinard : Contribution à l'étude de l'oxydation periodique des composés organiques hydroxylés. Action de l'acide periodique sur l'inositol. Thèse Doct. Univ. Pharm. Paris, 1945 12

FLEURY P. & BOISSON R. Etude de l'action de l'acide periodique sur l'acide lactique et ses produits de dégradation. Journ. Pharm. & Chim. 1939, 30, 145 14

FLEURY P. & GUITARD H. Dosage de la colamine en présence de la choline au moyen de l'acide periodique. Bull. Soc. Chim. Biol. 1946, 28, 651 11

FLEURY P. & LANGE J. Sur le dosage de l'acide periodique en présence de l'acide iodique Journ. Pharm. & Chim. 1933, 17, 107 15

FLEURY P. & LANGE J. Etude de l'action de l'acide periodique sur les composés hydroxylés. Journ. Pharm. & Chim. 1933, 17, 196 17

FLEURY P. & LECLERC M. La méthode nitrovanadomolybdique de Misson pour le dosage colorimétrique du phosphore. Son intérêt en biochimie. Bull. Soc. Chim. Biol. 1943, 25, 201 — 3

GLICK D. Concerning the Reineckate method for the determination of cholin Journ. Biol. Chem. 1944, 156 — 10

HOROWITZ & BEADLE A microbiological method for the determination of cholin by use of a mutant of Neurospora. Journ. Biol. Chem. 1943, 150, 325 — 22, 23

KAHANE E. Un nouveau réactif de précipitation des bases organiques : le sel de Reinecke. Journ. Pharm. & Chim. 1935, 22, 254. — 9

KAPFHAMMER & BISCHOFF C. Acetylcholin und cholin aus tierischen Organen. I. Mitteilung. Darstellung aus Rinderblut. Zeit. f. Physiol. Chem. 1930, 191, 179 — 8

LEVENE & ROLF. The preparation and purification of lecithin. Journ. Biol. Chem. 1927, 72, 587 — 19, 26

MAC FARLANE & KNIGHT. The lecithase activity of Clostridium Welchii; d'après The biochemistry of bacterial toxins. Biochem. Jour. 1941, 35, 884 — 1

MACHEBOEUF M. Méthode permettant le dosage exact du phosphore dans de petites quantités de sang. Bull. Soc. Chim. Biol. 1926, 8, 464 — 5

MALAPRADE L. Etude de l'action des polyalcools sur l'acide periodique et les periodates alcalins. Bull. Soc. Chim. France, 1934, 1, 833 — 16

NICOLET B.H. & SHINN L.A. The action of periodic acid on α-amino alcohols. Journ. Amer. Chem. Soc. 1939, 61, 1615 — 13, 24

PANGBORN M.C. A note on the purification of lecithin. Journ. Biol. Chem. 1941, 137, 545 — 20

PANGBORN M.C. Note on purification of lecithin
for serological use.
Journ. Biol. Chem. 1945, 157, 77 21

SIFFERD R.H. (to Armour and C°) U.S. 2,371, 476, 1945
d'après
Chemical Abstracts 1945, 49, 3376 27

-:-:-:-:-:-:-:-:-:-

TABLE DES MATIERES

Pages

INTRODUCTION 1

CHAPITRE I : Techniques de dosages utilisées..... 3

A/ Dosage du phosphore..... 3
B/ Dosage de l'azote..... 11
C/ Dosage du cadmium..... 13
D/ Dosage de la choline..... 24
E/ Dosage de la colamine en présence de choline au moyen de l'acide periodique..... 29

CHAPITRE II : Etude de la matière première..... 38

A/ Lécithine d'oeuf commerciale..... 38
B/ Lécithine cadmique préparation..... 41

CHAPITRE III : Etude de l'hydrolyse..... 46

I/ Mise au point des divers stades de la technique 46

1) Conditions d'hydrolyse d'une solution alcoolique de lécithine..... 46
2) Indice de saponification..... 47
3) Extraction des acides gras..... 47
4) Extraction de la choline..... 50
Résultats..... 52

II/ Description de la technique finalement utilisée... 60

A/ Exemple d'un essai complet sur un prélèvement de 2 cm3..... 61
B/ Résultats..... 66

CHAPITRE IV : Tentatives d'isolement du glycérophosphatogène..... 75

Tentative d'adsorption du GPG par la déminéralite..... 79
A propos de la purification du GPG..... 82

CHAPITRE V : Quelques propriétés du glycérophosphatogène..... 85

Solubilité..... 85
Propriétés chimiques..... 85

1) Le rapport base/phosphore dans le sel neutre. 85
2) Hydrolyse en milieu acide et alcalin..... 85
3) Stabilité à pH 4,1 environ..... 86

Conclusion..... 87

CHAPITRE VI : Essai d'hydrolyse d'échantillons de lécithine purifiée préparée à partir de la lécithine cadmique..... 89

A/ Préparation de la lécithine purifiée à partir de la lécithine cadmique..... 89
B/ Etude de l'hydrolyse sur des échantillons de lécithine purifiée en passant par la lécithine cadmique..... 93

1) Lécithine L_1..... 93
2) Lécithine L_2..... 94

Conclusions..... 95

RESUME & CONCLUSION..... 96

BIBLIOGRAPHIE..... 98

TABLE DES MATIERES..... 101

-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-